

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik
im Dr. von Haunerschen Kinderspital
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Professor Dr. med. Dietrich Reinhardt

**Der Einfluss von Alpha-1-Antitrypsin Inhalation auf die neutrophile
Entzündungsreaktion bei Patienten mit cystischer Fibrose**



Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnheilkunde
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Tobias Petersen
aus
Pfaffenhofen an der Ilm
2008

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter:

Prof. Dr. M. Griesse

Mitberichterstatter:

Prof. Dr. M. Thiel

Prof. Dr. U. Bürger

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dr. D. Hartl

Dekan:

Prof. Dr. Dr. h.c. M. Reiser, FACR

Tag der mündlichen Prüfung:

28. Oktober 2008

Meiner Frau Nicole und meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis	3
1. Einleitung	
1.1 Cystische Fibrose	5
1.2 Die Lungenerkrankung bei cystischer Fibrose ist charakterisiert durch eine neutrophile Entzündungsreaktion	6
1.3 Neutrophile Granulozyten schädigen das Lungengewebe von Patienten mit cystischer Fibrose durch proteolytische Aktivität	6
1.4 Alpha-1-Antitrypsin ist der physiologische Inhibitor der neutrophilen Elastase	7
1.5 Der Oberflächenmarker CD11b auf neutrophilen Granulozyten spiegelt den Schweregrad der Entzündung wider	7
1.6 Induziertes Sputum ist eine sichere Methode um die neutrophile Entzündungsreaktion in den Atemwegen von Patienten mit cystischer Fibrose zu untersuchen	8
2. Zielsetzung	9
3. Material und Methoden	10
3.1 Material	10
3.1.1 Patienten und Studiendesign	10
3.1.2 Geräte	10
3.1.3 Materialien und Reagenzien für FACS	11
3.1.4 Materialien und Reagenzien für ELISA	11
3.1.5 Antikörper für FACS	12
3.2 Methoden	12
3.2.1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay	12
3.2.2 Nachweis und Messung der Zytokine	12
3.2.3 Sputuminduktion	13
3.2.4 Probenaufbereitung	13
3.2.5 Sputumaufbereitung für die Durchflusszytometrie	14
3.2.6 Durchflusszytometrie	14

3.2.7 Oberflächenmarker	17
3.2.8 Statistik	17
4. Ergebnisse	18
4.1 Patientengruppen	18
4.2 Präanalytische Einflüsse und Reliabilität	18
4.3 Alpha-1-Antitrypsin und neutrophile Elastase	20
4.4 Neutrophile Granulozyten	22
4.5 CD11b Expression auf neutrophilen Granulozyten	23
4.6 Proinflammatorische Zytokine/ Lipidmediatoren	23
4.7 Korrelationen	26
5. Diskussion	28
5.1 Einfluss von DTT und Verarbeitungszeit	28
5.2 Alpha-1-Antitrypsin und neutrophile Elastase	28
5.3 Neutrophile Granulozyten	29
5.4 CD11b	30
5.5 Proinflammatorische Zytokine/ Lipidmediatoren	32
5.6 Einschränkungen	33
5.7 Pathophysiologisches Modell	34
6. Zusammenfassung	36
7. Anhang	38
7.1 Literaturverzeichnis	38
7.2 Tabellenverzeichnis	49
7.3 Abbildungsverzeichnis	50
7.4 Danksagung	51
7.5 Lebenslauf	52

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
U/min	Umdrehungen pro Minute
µl	Mikroliter
AK	Antikörper
AAT	Alpha-1-Antitrypsin
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BALF	Bronchoalveoläre Lavage Flüssigkeit
CD	Cluster of differentiation
CF	Cystische Fibrose
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
CR	Complement Receptor
DTT	Dithiothreitol
ELF	Epithelial lining fluid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	Fluorescence-activated cell sorter
FCM	Flow cytometric methods
FEV ₁	Forcierte expiratorische Vitalkapazität in einer Sekunde
fMLP	Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine
FSC	Forward angle light scatter
FVC	Forcierte Vitalkapazität
IL-	Interleukin-
IS	Induziertes Sputum
LPS	Lipopolysaccharid
LTB ₄	Leukotrien B ₄
MFI	Mean fluorescence intensity
min	Minute(n)
NE	Neutrophile Elastase
NG	Neutrophile Granulozyten
PAF	Platelet activating factor
PB	Peripheres Blut
PBS	Phosphate-buffered-saline

RT

Raumtemperatur

SCC

Side angle light scatter

TNF- α

Tumor-necrosis-factor alpha

1. Einleitung

1.1 Cystische Fibrose

Die Mukoviszidose oder cystische Fibrose (CF) ist eine autosomal rezessiv vererbte, nicht heilbare Erkrankung³⁰. Sie ist die häufigste erbliche Erkrankung der Lunge in der kaukasischen Bevölkerung mit einer Inzidenz von 1:2500 Neugeborenen^{26,28,29,38,62,71}. CF wird durch Mutationen im CFTR-Gen ("cystic fibrosis transmembrane conductance regulator") auf Chromosom 7 verursacht. Fünf Prozent der Bevölkerung sind gesunde Merkmalsträger, die CF weitergeben können. Ist nur ein Elternteil erkrankt, sind die Kinder Genträger und können das defekte Gen später an die eigenen Kinder weitergeben. Wenn beide Eltern erkrankt sind, werden auch alle Kinder an Mukoviszidose erkranken, was allerdings sehr selten ist, da Männer mit CF meist steril und Frauen weniger fruchtbar sind als gesunde Frauen. Eine pränatale Diagnose ist möglich. Bei Erkrankten ist durch die Fehlfunktion von Chloridkanälen die Zusammensetzung aller Sekrete exokriner Drüsen verändert. In Lunge, Bauchspeicheldrüse, Dünndarm, Gallenwegen und Schweißdrüsen werden zähflüssige Sekrete gebildet, die nur erschwert vom Körper abtransportiert werden können. Dadurch kommt es in den betroffenen Organen zu Funktionsstörungen unterschiedlicher Art. Das betroffene Gen cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) codiert ein Eiweißmolekül, das in der Zellmembran als Chloridkanal fungiert. Durch den Defekt im Gen wird das Protein verändert und die Kanalfunktion gestört. Die häufigste Mutation wird $\Delta F508$ genannt. $\Delta F508$ bezeichnet das Fehlen der Aminosäure Phenylalanin (= F) an der Position 508 im Protein und betrifft etwa 70 Prozent aller Erkrankten. Bisher sind insgesamt über 1000 verschiedene Mutationen des CFTR-Gens bekannt. Ca. 8000-9000 Menschen in Deutschland sind an CF erkrankt und ca. 4-5 Prozent sind gesunde Genträger. Durch Verbesserung der medikamentösen und physiotherapeutischen Behandlung von CF Patienten hat sich die Prognose der Betroffenen in den letzten Jahren erheblich verbessert. Dennoch bleibt die Prognose infaust. Die therapeutischen Möglichkeiten sind rein symptomatisch. Die Lebenserwartung für Erkrankte liegt bei etwa 32-35 Jahren.

1.2 Die Lungenerkrankung bei cystischer Fibrose ist charakterisiert durch eine neutrophile Entzündungsreaktion

Die Lungenerkrankung bestimmt die Morbidität und Mortalität von CF Patienten. Die Atemwege von CF Patienten sind gekennzeichnet durch chronisch bakterielle Infektionen, vor allem durch *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* und *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*). Bakterielle Produkte, z.B. von *P. aeruginosa*, führen zu einem Anstieg der Interleukin-8 (IL-8) Produktion durch Epithelzellen der Atemwege³¹. IL-8 rekrutiert neutrophile Granulozyten (NG) aus der Zirkulation in die Atemwege. Durch die chronisch bakterielle Infektion kommt es zu einer progressiven Ansammlung von NG in den Atemwegen von CF Patienten. Im Verbund mit NG finden sich erhöhte Spiegel der proinflammatorischen Zytokine bzw. Lipidmediatoren IL-1 β , Tumornekrosefaktor α (TNF- α), Leukotrien B₄ (LTB₄) und IL-6 in den Atemwegen von CF Patienten^{20;49}. Zusammenfassend bezeichnet man die Entzündungsreaktion der CF Lungenerkrankung als eine neutrophile Entzündungsreaktion. Die neutrophile Entzündungsreaktion der CF Lungenerkrankung ist allerdings überschießend, das heißt die Inflammation geht über das Ziel, Abwehrzellen zu rekrutieren, hinaus und führt somit zu einer ständigen Reizung des Bronchoalveolartraktes in den CF Atemwegen.

1.3 Neutrophile Granulozyten schädigen das Lungengewebe von Patienten mit cystischer Fibrose durch proteolytische Aktivität

NG sind die effizientesten Abwehrzellen des angeborenen Immunsystems gegen bakterielle Infektionen. Bei CF Patienten zeigen NG jedoch veränderte Eigenschaften. Anstatt Bakterien abzutöten, führen NG in den Atemwegen von CF Patienten zu einer überschießenden neutrophilen Entzündungsreaktion. Die NG enthalten zahlreiche proteolytische Enzyme (Proteasen), welche sie nach Aktivierung aus intrazellulären Granula freisetzen. Quantitativ am bedeutendsten sind die azurophilen Granula, welche Myeloperoxidase sowie Serinproteasen, wie neutrophile Elastase (NE), Cathepsin G, Proteinase-3, Defensin und Lysozym enthalten^{21;23}. Freie Proteasenaktivität, eigentlich zur Abwehr von bakteriellen Pathogenen gedacht, führt im Rahmen der überschießenden NG Aktivierung zu einer sukzessiven Zerstörung des Lungenparenchyms von CF Patienten^{14;80}. Die NE spielt unter den NG-assoziierten Proteasen dabei pathophysiologisch die bedeutendste Rolle. Diese kann extrazelluläre Strukturproteine des Lungengewebes, wie Elastin, Kollagen und Proteoglykane abbauen und führt so zu einer schrittweisen Zerstörung des Lungengerüsts bei CF Patienten²². Sie ist darüber hinaus ein potentes Sekretagoga, fördert die Sekretproduktion der

submukösen Drüsenzellen⁸⁴ und hemmt den Zilienschlag *in vitro*^{55;88}. Die Anwesenheit von NE stimuliert die Produktion proinflammatorischer Zytokine, wie IL-8 und LTB₄, was wiederum eine Rekrutierung von NG in die Atemwege bewirkt^{41;64}. NG sezernieren NE, womit sich der positive Feedback-Kreis schließt, der letztendlich zu der proteolytischen Zerstörung des Lungengewebes führt. Durch die überschießende NG Reaktion und deren pathophysiologische Konsequenzen sind NG von zentraler Bedeutung im Verständnis der Pathogenese der CF Lungenerkrankung.

1.4 Alpha-1-Antitrypsin ist der physiologische Inhibitor der neutrophilen Elastase

Alpha-1-Antitrypsin (AAT) gehört zur Gruppe der natürlich vorkommenden Serin-Protease-Inhibitoren, welche die Aktivität von freien Proteasen hemmen und somit die dadurch erfolgende Gewebeschädigung verhindern. Man spricht in diesem Zusammenhang von einem Gleichgewicht von Proteasen und Antiproteasen. Dieses Gleichgewicht ist bei chronischen Entzündungsreaktionen, wie der CF Lungenerkrankung, gestört. Das AAT liegt bei gesunden Patienten in hohen Konzentrationen vor und dient dabei als Antiprotease- Schutzschild gegen destruktive Einflüsse der NE¹⁷. Bei CF Patienten wird AAT komplexiert¹⁸ und proteolytisch inaktiviert⁸⁵. In den Atemwegsflüssigkeiten von CF Patienten kommt es durch die hohe Aktivität der NE schließlich zu einem relativen Mangel an AAT, was zu unkontrollierter Aktivität von NE und daraus resultierender Gewebeschädigung führt. Ein Ziel bei der CF Lungenerkrankung ist es daher, NE mit Hilfe von AAT zu neutralisieren^{4;17}.

1.5 Der Oberflächenmarker CD11b auf neutrophilen Granulozyten spiegelt den Schweregrad der Entzündung wider

Die Aktivierung von NG ist verbunden mit einer Erhöhung der Komplementrezeptoren CD35 (CR1) und CD11b (CR3). Diese Rezeptoren dienen als Proteine für die Adhärenz und sind notwendig für die Migration und Phagozytose¹⁵. Über die spezifische Bindung an Rezeptoren auf NG und Makrophagen opsonisieren die Komplementfaktoren C3b und iC3b Partikel im Rahmen der Phagozytose. Die C3b- und iC3b-abhängige Phagozytose von Mikroorganismen stellt einen wichtigen Mechanismus der Abwehr gegenüber systemischen Bakterien- und Pilzinfektionen dar. Sie kann aber auch pathologisch zur Gewebeschädigung führen. Dabei können als Antwort auf eine akute Entzündung gesunde Zellen zerstört werden. Am Ort des Entzündungsgeschehens kommt es durch Komponenten der Komplementkaskade zu einer Anhäufung von NG, die sich den infizierten Organismen anheften und phagozytieren. Die dadurch freigesetzten freien Radikale und Proteasen zerstören zwar die infizierten Zellen,

können darüber hinaus allerdings auch gesundes Gewebe schädigen. Bei CD11b handelt es sich um ein β -Integrin, das für die Adhäsion, Diapedese und Phagozytose der NG eine Rolle spielt^{68;93}. Gespeichert in intrazellulären Granula unstimulierter NG^{61;75;83} liegt es unter physiologischen Bedingungen in äußerst geringer Expression in NG vor. Erst nach Aktivierung durch Pathogene bzw. deren Produkte steigt die CD11b Expression auf NG an. Dieser rasche Anstieg nach Pathogenexposition macht CD11b zu einem hervorragenden Indikator für das Vorliegen einer Infektion bzw. Inflammation^{6;39;50;53;56;81;82}. So wurde gezeigt, dass die NG in der bronchoalveolären Lavage (BAL) Flüssigkeit von CF Patienten eine erhöhte Expression von CD11b zeigen¹⁶. CD11b kann somit als Aktivierungsmarker von NG angesehen werden.

1.6 Induziertes Sputum ist eine sichere Methode um die neutrophile Entzündungsreaktion in den Atemwegen von Patienten mit cystischer Fibrose zu untersuchen

Neben invasiven Methoden, wie Lungenbiopsie oder BAL, stellt die Induktion von Sputum eine einfache, nichtinvasive, sichere und reproduzierbare Methode dar, um die neutrophile Entzündungsreaktion in den Atemwegen von CF Patienten zu untersuchen^{3;13;37;43;78}. In induziertem Sputum (IS) lassen sich nach entsprechender Verarbeitung lösliche Proteine sowie zelluläre Bestandteile analysieren. In IS von CF Patienten findet man eine hohe Anzahl von NG und hohe Spiegel proinflammatorischer Mediatoren, weshalb sich diese Methode im Besonderen zur Untersuchung der neutrophilen Entzündungsreaktion der CF Lungenerkrankung eignet.

2. Zielsetzung

Das Ziel dieser Studie war es, den Einfluss der AAT Inhalation auf die neutrophile Entzündungsreaktion bei Patienten mit CF zu untersuchen. Wir stellten dabei die Hypothese auf, dass die Inhalation von AAT das Missverhältnis von Proteasen zu Antiproteasen in der Lunge von CF Patienten positiv beeinflusst.

Es ergaben sich folgende spezifische Fragestellungen:

- Führt die 4-wöchige Inhalation von AAT zu einer Abnahme der NG im IS von CF Patienten?
- Welchen Einfluss hat die AAT Inhalation auf die Spiegel der proinflammatorischen Mediatoren IL-8, IL-1 β , TNF- α und LTB₄ im IS von CF Patienten?
- Welchen Einfluss hat die AAT Inhalation auf die Expression des Oberflächenmarkers CD11b auf NG im IS von CF Patienten?

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Patienten und Studiendesign

Diese Studie wurde im Rahmen einer multizentrischen Studie mit den Studienzentren Frankfurt, Hannover, Giessen, Köln und München durchgeführt. Das Studien-Monitoring erfolgte durch Acromion GmbH (Frechen). Von allen Studienzentren wurden Ethikanträge bei den jeweiligen Ethikkommissionen beantragt und bewilligt. Von allen Patienten wurde vor Studienbeginn eine schriftliche Einverständniserklärung eingeholt. Einschlusskriterien für die Aufnahme in die Studie waren die gesicherte Diagnose von CF durch klinische Symptome, positiver Schweißtest und/oder Mutationen im CFTR Gen. Weitere Einschlusskriterien waren ein Mindestalter von 8 Jahren, eine Lungenfunktion von einem forcierten expiratorischen Volumen in einer Sekunde (FEV_1) $> 25\%$, positive neutrophile Elastase Aktivität nachweisbar im IS vor Studienbeginn, positiver Test auf *P.aeruginosa* zu Studienbeginn, sowie die schriftliche Zustimmung seitens des Patienten. Ausschlusskriterien waren eine Lungentransplantation, schwerwiegende Begleiterkrankungen, schwere Leberzirrhose mit Aszites, aktive pulmonale Exazerbation, gewohnheitsmäßiger Zigarettenkonsum sowie Schwangerschaft. Es wurde isoliertes, monomeres humanes AAT (Prolastin, Bayer Corporation, Clayton, NA, USA) verwendet. Es wurde eine Konzentration verwendet, die einer Deposition von 25 mg/Tag entspricht. Initial wurde AAT mittels peripherer und bronchialer Depositionsmethode inhalativ verabreicht. Da jedoch in diesen Pilotstudien kein Unterschied zwischen beiden Depositionsmethoden gefunden wurde, entsprechen die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Daten einem gepoolten Datensatz. Es wurden in der Studienpopulation keine unerwünschten Nebenwirkungen festgestellt.

3.1.2 Geräte

- | | |
|--|-----------------------|
| • Ultrazentrifuge Varifuge 20 RS | Heraeus Sepatech |
| • Tischzentrifuge 5415C | Eppendorf |
| • Mischgerät: Vortex-Genie 2 | Scientific Industries |
| • Neubauerkammer | Merck |
| • Mikropipetten
(0-10µl; 10-100µl; 20-1000µl) | Eppendorf |
| • Durchflusszytometer (FACS)
FACSCalibur | Becton & Dickinson |
| • FACS Auswertestation | Apple |

Macintosh Power PC

- FACS Auswertesoftware

Cell Quest 3.1f

- Notebook

ACER

Windows XP

- Prism 3.0

Becton & Dickinson

ACER

Aspire 2001 WLMi

Graph Pad Software

3.1.3 Materialien und Reagenzien für FACS

- Reaktionsgefäße
- Plastikspitzen für Mikropipetten
- Plastikröhrchen (15ml/50ml)
- Rundbodenröhrchen „Falcon“ (5ml)
- Nitex Gaze Filter
- Hanks Puffer
- Dithiothreitol (DTT, Sputolysin)
- Annexin V-fluoresceine isothiocyanate
- Propidium iodide

Eppendorf

Schubert/Pharmacia

Falcon

Becton & Dickinson

BD Biosciences

GIBCO

Calbiochem Biosciences

Boehringer Mannheim

Sigma

3.1.4 Materialien und Reagenzien für ELISA

- ELISA Quantikine Kits für IL-8, TNF- α und IL-1 β
- LTB₄ ELISA Kit
- Substrat: HRP Substrate TMB (Tetramethylbenzidine)
Solutions for ELISA
- Stopplösung: 2N H₂SO₄
- Mikrotiterplatten
- ELISA-Washing unit
- IPS Heizblock für Mikrotiterplatten
- Anthos HT III Mikrotiterplattenleser

R & D Systems

Amersham

Uptima

Nunc

Behring

Sanofi

Anthos Labtec

3.1.5 Antikörper für FACS

- CD45-allophycocyanine (APC) mouse IgG1 BD Pharmingen
- CD16-fluorescein isothiocyanate (FITC) mouse IgG1 BD Pharmingen
- CD11b-PE mouse IgG2b BD Pharmingen
- mouse IgG2b-PE, mouse IgG1-APC, mouse IgG1-FITC Immunotech

3.2 Methoden

3.2.1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Unter Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) versteht man die quantitative Messung eines bestimmten Proteins in einem Medium mittels enzymgekoppelter Antikörper (AK). Zunächst wird ein Stoffgemisch mit einem AK inkubiert, der spezifisch das gesuchte Protein erkennt und an dieses bindet. Dieser primäre AK wird anschließend von einem sekundären erkannt und gebunden, welcher wiederum mit einem Enzym gekoppelt ist. Nach Zugabe einer Farbreagenz wird diese durch das indirekt an die gesuchte Substanz gekoppelte Enzym verändert. Die Intensität der Farbreaktion ist somit von der Konzentration der gesuchten Substanz im Stoffgemisch abhängig.

3.2.2 Nachweis und Messung der Zytokine

Es wurde gemäß dem mitgelieferten Protokoll verfahren. Alle Arbeitsschritte wurden bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt. Eine Mikrotiterplatte mit einem gecoateten AK wurde benutzt und mit Standards oder den Proben für 2 Stunden bei RT inkubiert. Nach einem Waschschrift wurde die Mikrotiterplatte für 2 Stunden mit einer zweiten AK-Lösung (Konjugatantikörper) inkubiert. Wieder wurde die Platte gewaschen und mit 100 µl eines Enzymkonjugats (Streptavidin konjugiert mit Peroxidase) pro Well für 20 Minuten (min) inkubiert. Schließlich wurde ein letztes Mal gewaschen, für 20 min mit 100 µl einer Substratlösung inkubiert und die Substratreaktion mit 50 µl einer H₂SO₄-haltigen Lösung gestoppt. Die Absorption wurde bei 450 nm mittels Photometer gemessen.

3.2.3 Sputuminduktion

Vor der Sputuminduktion wurde eine Spirometrie durchgeführt, die Sauerstoffsättigung gemessen, auskultiert, und 2 Hub Sultanol verabreicht, um eine Bronchokonstriktion zu vermeiden. Danach wurde für die Dauer von 15 min mittels Pari LC Plus oder Pari LC Star, sowie einem Pari Master Kompressor mit 5 ml einer 5,85%igen NaCl-Lösung vernebelt. Der Speichel wurde in einen getrennten Behälter vor dem Hochhusten des IS verworfen. Das IS wurde nach 5, 10, 15 min (falls nötig auch zwischenzeitlich) in einem sterilen Sputum-Container (auf Eis bei 4°C) gesammelt. 5 min nach dem Ende der IS Kollektion erfolgten eine erneute Spirometrie, Messung der Sauerstoffsättigung und eine Auskultation. Das Volumen des gesamten expektorierten IS wurde durch das Hochziehen in einer 20 Milliliter (ml) Spritze gemessen.

3.2.4 Probenaufbereitung

Die gewonnenen IS Proben wurden mit Dithiothreitol (DTT, Sputolysin) inkubiert, über Nitex Gaze filtriert und zentrifugiert, um die NG aus dem Schleim des IS zu lösen. IS Zellen wurden mikroskopisch mittels Zytospin und May-Grünwald-Färbung analysiert. Zur Zellgewinnung wurde das IS mit der gleichen Menge Sputolysin versetzt, gevortext, für 15 min in ein auf 37°C temperiertes Schüttelwasserbad gestellt und alle 5 min gemischt. Danach wurde das Suspensionsvolumen abgelesen, mit der gleichen Menge eines 1:1 Gemisches aus 0,9%iger NaCl-Lösung und Sputolysin versetzt, erneut für 10 min im Wasserbad geschüttelt und im Anschluss über Nitex Gaze gefiltert. Die so erhaltene Lösung wurde Sputumsuspension genannt. 10 µl dieser Sputumsuspension wurden in einer Neubauerkammer ausgezählt. Das Resultat dieser Zählung wurde mit 2,5 (Faktor Neubauerkammer) und 1000 multipliziert, um die Zellzahl/ml zu erhalten. Die Sputumsuspension wurde dann bei 4°C und 1600 U/min für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und erneut bei 3493 U/min und 4°C für 20 min zentrifugiert. Der so gewonnene Überstand wurde zur Aufbewahrung bei -80°C in Eppendorfgefäße mit und ohne Inhibitor abgefüllt. Das Zellpellet der ersten Zentrifugation wurde dann mit 10 ml Hankscher Lösung versetzt und erneut bei 1600 U/min und 4°C für 10 min zentrifugiert. Die Zellen dieser Zentrifugation wurden mit einem zu errechnenden Volumen an Hankscher Lösung aufgeschwemmt, um 200 000 Zellen pro Objektträger zu erhalten.

3.2.5 Sputumaufbereitung für die Durchflusszytometrie

Die in Hankscher Lösung vorliegenden Zellsuspensionen wurden bei 1300 U/min 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet je nach Größe mit bis zu 1,5 ml PBS verdünnt und anschließend gevortext. Dann wurden je 50 µl der Suspension in 5 nummerierte Eppendorfgefäße pipettiert, mit Fc-Serum für 20 min inkubiert zur Blockierung unspezifischer Bindungen und danach mit vorbereiteten spezifischen monoklonalen AK-Mischungen versetzt und erneut gevortext. Nach 30 min Inkubationszeit bei 4°C wurden die so vorbereiteten Proben mit 1 ml PBS versetzt, resuspendiert und anschließend für 5 min bei 5000 U/min zentrifugiert. Der Überstand dieser Suspension wurde erneut verworfen, das Zellpellet mit 300 µl PBS resuspendiert und für die Durchflusszytometrie in die dafür vorgesehenen Glasröhrchen pipettiert, gevortext und anschließend im FACS Gerät analysiert. Vor Beginn der Studie wurden das Gating der NG und die Abgrenzung zu Alveolarmakrophagen optimiert. Propidium iodide (5µg/ml) und Annexin V (5µg/ml, 1/100) wurden benutzt um apoptotische (Annexin V⁺ PI⁻) und nekrotische (Annexin V⁺ PI⁺) Zellen zu detektieren. Nur viable Zellen (Annexin V⁻ PI⁻) wurden in die FACS Auswertung einbezogen.

3.2.6 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie wird mittels so genannter FACS Geräte durchgeführt. (FACS = Fluorescence activated cell sorter). Dabei führt man suspendierte Einzelzellen an einem Laser vorbei und kann anhand der mittels Detektoren nachgewiesenen charakteristischen Signale sowohl zelluläre Oberflächenproteine bestimmen, als auch extra- und intrazelluläre Antigene identifizieren, wenn fluoreszenzgefärbte AK verwendet wurden. Zur Durchführung einer solchen Bestimmung sind AK, Fluoreszenzfarbstoffe und ein Durchflusszytometer nötig.

Der Ablauf einer Zelluntersuchung anhand der Durchflusszytometrie besteht aus:

A. Färbung mittels Fluoreszenzfarbstoffen

B. Messung

C. Auswertung

A. Fluoreszenzfärbung

Bei der Fluoreszenzfärbung müssen die direkte und die indirekte unterschieden werden. Bei letzterer bindet ein fluoreszenzmarkierter zweiter AK an den ersten spezifischen AK, wohingegen bei ersterer die AK direkt mit Fluorochromen konjugiert werden. Mittels eines Argonlasers lassen sich die Fluorochrome anregen und deren Emissionsspektrum detektieren.

Fluorchrom	Max. Anregung	Emission	Farbe
FITC	488nm	520nm	Grün
APC	595nm/633nm	660nm	Rot
PC5	488nm	670nm	Rot
PE	488nm	575nm	Rot-Orange

Tabelle 1: verwendete Fluorchrome

nach Becton & Dickinson / Pharmingen Research Product Catalog 2004

Bei dem von uns verwendeten Durchflusszytometer handelt es sich um ein so genanntes 4-Farben-Durchflusszytometer, mit dessen Hilfe die gleichzeitige Messung von bis zu 4 Fluorochromen in einer Probe möglich ist. Mit Hilfe von Titrationsreihen mit Vollblut wurde die optimale AK-Konzentration ermittelt, jede Probe mit vier verschiedenen AK-Kombinationen versetzt und im FACS Gerät analysiert (siehe Tab. mit AK-Kombinationen)

Färbeprotokoll für Sputumproben:

- 250 µl resuspendiertes Zellpellet (Sputum) wurde zu je 50 µl auf fünf 1,5 ml Eppendorf-Gefäße aufgeteilt.
- Die AK wurden je nach Art und Anzahl den Reaktionsgefäßen zugefügt, gevortext und anschließend für 30 min bei 4°C inkubiert.
- Dann wurden die Proben mit 1 ml PBS gewaschen und bei 5000 U/min für 5 min zentrifugiert und somit von freien AK gewaschen.
- Abschließend wurde das Zellpellet mit 300 µl PBS resuspendiert und für die FACS Durchführung in Glasröhrchen pipettiert.

B. Messung

Das FACS Gerät besteht aus 3 Einheiten.

- **Flüssigkeitssystem**
- **Optisches System**
- **Umwandlungssystem**

Flüssigkeitssystem

Mit dem Einlegen der Probe in das FACS Gerät wird die Zellsuspension von einer Trägerflüssigkeit beschleunigt („Hydrodynamische Fokussierung“). Die Zellen werden dabei im Messpunkt fokussiert, passieren ihn einzeln und werden dabei vom Laser erfasst.

Optisches System

Das Detektionssystem besteht aus dem Bereich zur Messung des Vorwärtstreulichtes (FSC= Forward angle light scatter), dem Bereich zur Messung des Seitwärtstreulichtes (SSC= Side angle light scatter) und der spezifischen Fluoreszenz für jedes einzelne Fluorochrom. Abhängig von den unterschiedlichen physikalischen Zellparametern, wie Größe, Granularität und Membranstruktur, wird der Laserstrahl verschieden stark abgelenkt. Der FSC-Lichtstrahl, der die Zellen axial trifft, korreliert mit der Zellgröße, während der orthogonal die Zellen treffende SSC- Lichtstrahl mit der Granularität und äußeren Zellform korreliert.

Umwandlungssystem

Die so entstehenden optischen Signale können mit Hilfe äußerst empfindlicher Photodetektoren und Photodioden in elektrische Signale umgewandelt werden. Mittels Software können diese graphisch dargestellt und ausgewertet werden.

C. Auswertung

Die Datenauswertung erfolgte mit dem Programm Cell Quest 3.1f von Becton & Dickinson (siehe unter Material).

3.2.7 Oberflächenmarker

NG in IS wurden anhand der Laser-Streuungseigenschaften (FSC/SCC) und der NG Oberflächenmarker CD45 (Pan-Leukozytenmarker) und CD16 (Granulozytenmarker, FcγRIII) identifiziert. Die Expression von CD11b (MFI) wurde auf NG durchflusszytometrisch charakterisiert. Es wurden spezifische Isotypkontrollen verwendet, um unspezifische Fc-Bindungen auszuschließen. Ebenso wurden die Stabilität der CD11b Expression über 12 und 24 Stunden, sowie der Einfluss von DTT auf die Oberflächenmarkerexpression untersucht.

3.2.8 Statistik

Für den Vergleich der Werte vor, gegen und nach der AAT Therapie, wurde der nicht-parametrische Wilcoxon-Test mit Bonferroni Korrektur für multiple Vergleiche angewandt.

4. Ergebnisse

4.1 Patientengruppen

Zu Studienbeginn wurden 72 CF Patienten in die Untersuchung aufgenommen. Nach Ausschluss von 20 Patienten wegen Protokollverletzung bzw. Non-Compliance umfasste die Gruppe der untersuchten Patienten letztendlich 52 Patienten.

Parameter	Total (N = 52)
Rasse (Kaukasisch)	52
Geschlecht (weiblich)	26
Alter (Jahre)	25,3 \pm 8.9
Gewicht (kg)	59 \pm 9.1
FVC	3,2 \pm 0.9
FEV1	2,2 \pm 0.9

*Tabelle 2: Patientengruppen mit peripherer und bronchialer Deposition
Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen vom Mittelwert*

4.2 Präanalytische Einflüsse und Reliabilität

Untersucht wurden Einflussfaktoren, die durch die Aufbereitung der IS Proben mit DTT und der Lagerungszeit der Proben entstehen könnten. Die in dieser Studie untersuchten Oberflächenmarker wiesen nach zwölfstündiger Lagerung bei 4°C eine ähnliche Expression auf wie bei sofort nach Induktion erfolgter Analyse. Es wurde kein Einfluss von DTT auf die Expression der untersuchten NG Rezeptoren gefunden. Sowohl für NG, die aus dem peripheren Blut (PB) isoliert wurden, als auch für IS NG ergaben sich keine signifikanten Veränderungen durch DTT. Die Behandlung der Proben mit DTT zeigte ebenso keinen signifikanten Einfluss auf die Konzentrationen von IL-8, TNF- α , IL-1 β und LTB₄ im IS Überstand. Bei zwanzig CF Patienten wurden die NG sowohl mittels Zytospin, als auch mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert. Die Prozentsätze von NG im IS korrelierten positiv mit dem prozentualen NG Anteil, welcher differentialzytologisch mittels Zytospin ermittelt

wurde (Abbildung 1). Aufgrund der hohen Korrelation und Reproduzierbarkeit ($r=0.82$, $p<0.01$) und der methodologischen Vorteile der Durchflusszytometrie, wurden alle weiteren IS Proben per Durchflusszytometrie analysiert.

Für die Korrelation der Prozentsätze der NG, gemessen durch Zytospin und Durchflusszytometrie, ergaben sich folgende Befunde:

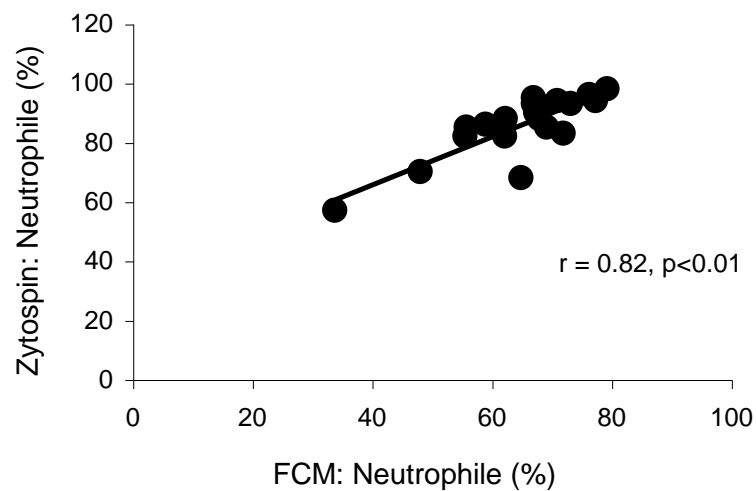


Abbildung 1: Prozentsätze für NG in IS, gemessen durch Zytospin und Durchflusszytometrie (FCM)

4.3 Alpha-1-Antitrypsin und neutrophile Elastase

Wir untersuchten die IS Proben hinsichtlich der AAT Konzentration und der Aktivität der NE. Dabei ergaben sich für die AAT Konzentration im IS folgende Befunde:

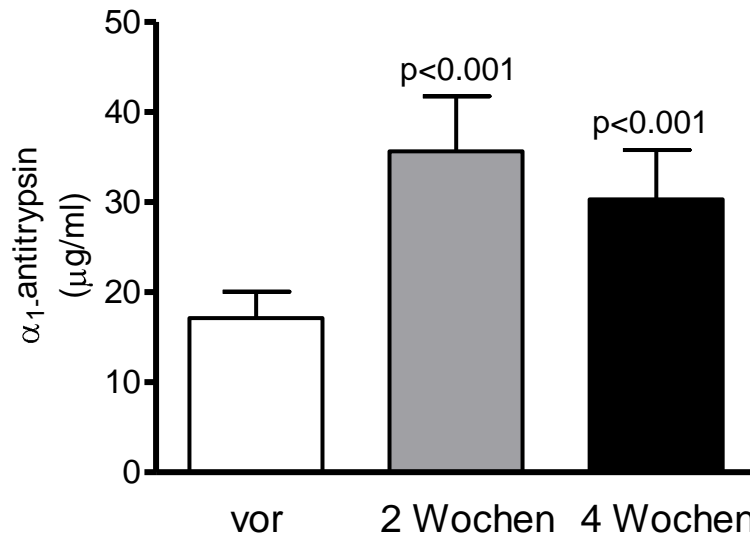


Abbildung 2: α_1 -Antitrypsin Konzentration im induzierten Sputum vor Beginn der Behandlung, sowie nach zwei und vier Wochen AAT Inhalation

Wie in Abbildung 2 gezeigt, stieg die AAT Konzentration im IS nach zwei und nach vier Wochen AAT Therapie, im Vergleich zu der Messung vor Studienbeginn, signifikant an. Dies bedeutet, dass die inhalative Therapie mit AAT zu einem robusten Anstieg von AAT im IS führte. Um zu sehen, ob die Erhöhung des AAT mit einer Erniedrigung der NE vergesellschaftet war, analysierten wir die Aktivität der NE im IS vor bzw. zwei und vier Wochen nach AAT Therapie.

Für die Aktivität der NE im IS ergaben sich folgende Befunde:

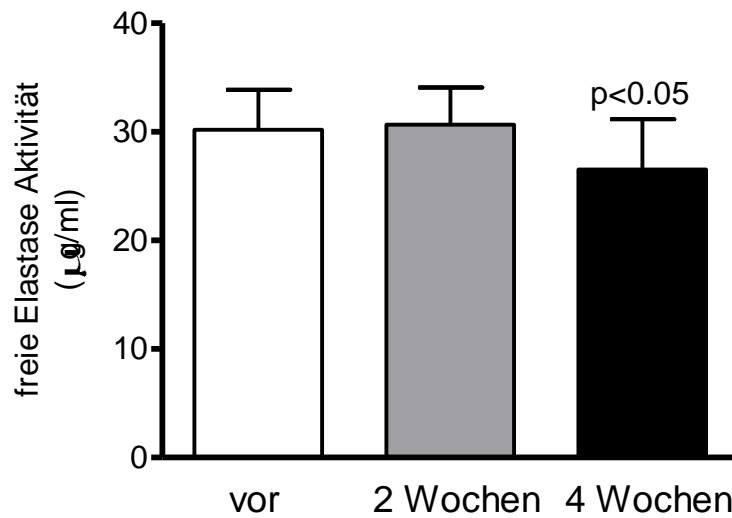


Abbildung 3: Aktivität der freien Elastase in induziertem Sputum vor Beginn der Behandlung, sowie nach zwei und vier Wochen AAT Inhalation

Im IS war die Aktivität der NE nach vier Wochen signifikant erniedrigt ($p < 0.05$), wobei sich nach zweiwöchiger AAT Therapie noch kein Effekt zeigte.

4.4 Neutrophile Granulozyten

Um zu überprüfen, ob die Inhalation mit AAT einen Einfluss auf die NG, die eine zentrale Stellung im Entzündungsgeschehen der CF Lunge einnehmen aufwies, untersuchten wir diese im IS dieser Patienten. Dabei ergaben sich für die prozentualen Anteile der NG im IS folgende Befunde:

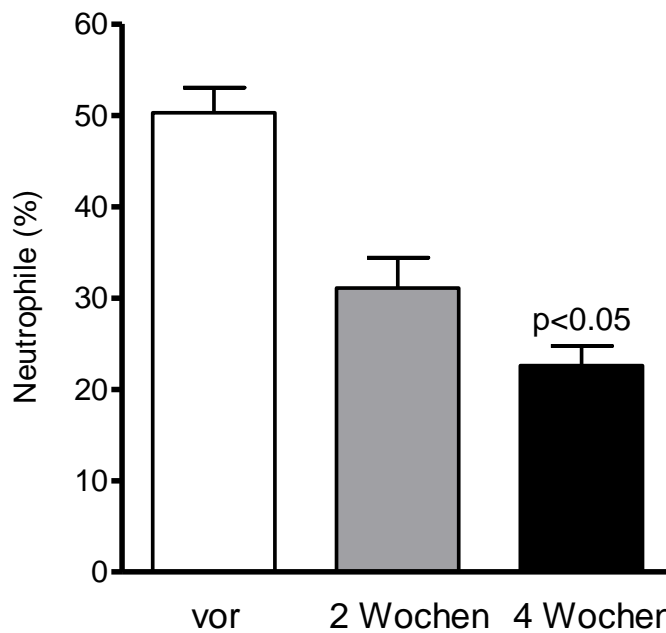


Abbildung 4: Prozentuale Anteile der NG vor Beginn der Behandlung, sowie nach zwei und vier Wochen AAT Inhalation

Der prozentuale Anteil der NG in den IS Proben sank nach vier Wochen der Inhalation mit AAT signifikant ($p<0.05$) (siehe Abbildung 4). Dies deutet darauf hin, dass die AAT Inhalation einen antiinflammatorischen Effekt auf die neutrophile Entzündungsreaktion in den CF Atemwegen hatte.

4.5 CD11b Expression auf neutrophilen Granulozyten

Wir untersuchten die NG im IS hinsichtlich der Expression des Oberflächenmarkers CD11b. Dabei ergaben sich folgende Befunde:

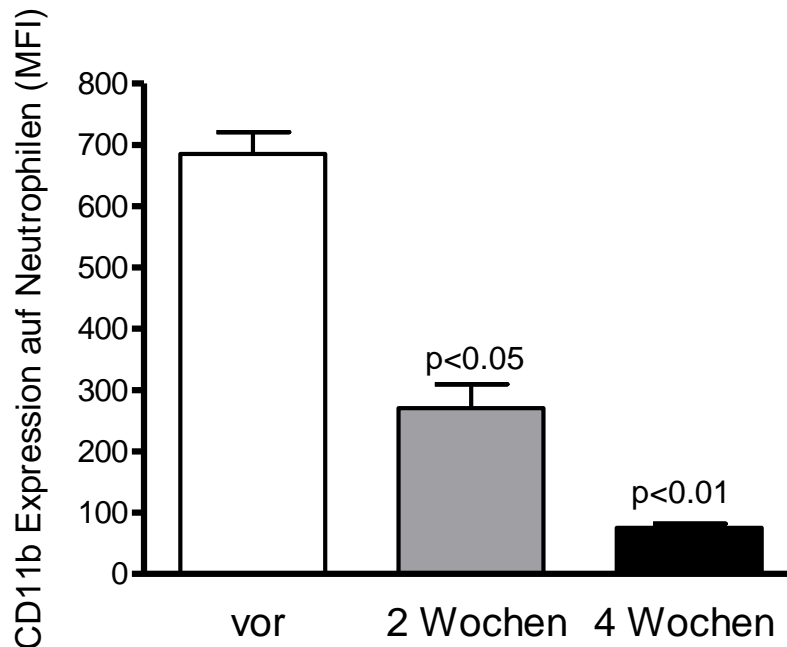


Abbildung 5: CD11b Expression auf den NG. MFI: Mean fluorescence intensity (= Fluoreszenz-Signalstärke auf den NG)

Die CD11b Expression auf NG nahm 2 und 4 Wochen nach Beginn der AAT Inhalation signifikant ab ($p < 0.05$ bzw. $p < 0.01$) (siehe Abbildung 5). Dies deutet darauf hin, dass die AAT Inhalationstherapie zu einer verminderten Aktivierung der NG in den CF Atemwegen führte und somit antiinflammatorisch wirkte.

4.6 Proinflammatorische Zytokine/ Lipidmediatoren

Um zu überprüfen, ob die Änderungen der Proteasen/Antiproteasen-Balance und die Abnahme der NG nach AAT Inhalation mit einer Änderung proinflammatorischer Zytokine einhergehen, untersuchten wir die proinflammatorischen Zytokine IL-8, IL-1 β , TNF- α und den proinflammatorischen Lipidmediator LTB₄ in den IS Überständen der entsprechenden CF Patienten vor bzw. zwei und vier Wochen nach AAT Therapie.

Für $\text{TNF-}\alpha$ und LTB_4 im IS ergaben sich folgende Befunde:

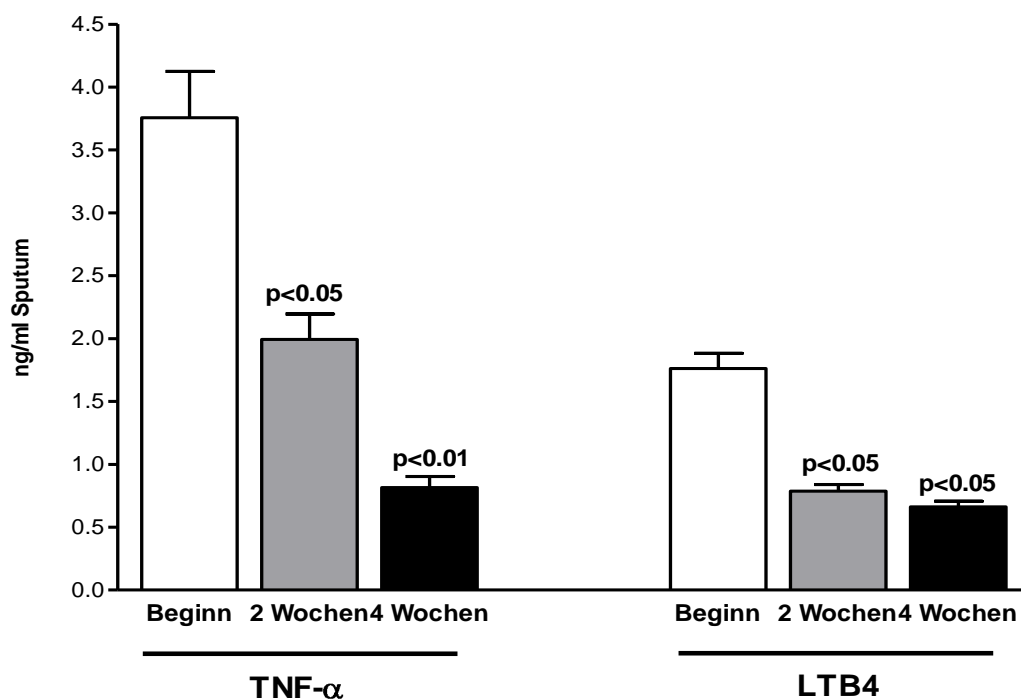


Abbildung 6: $\text{TNF-}\alpha$ und LTB_4 im Sputumüberstand vor Behandlungsbeginn, sowie nach zwei und vier Wochen AAT Inhalation.

Die Proteinkonzentrationen von $\text{TNF-}\alpha$ (Abbildung 6 links), LTB_4 (Abbildung 6 rechts), $\text{IL-1}\beta$ (Abbildung 7) und IL-8 (Abbildung 8) sanken zwei und vier Wochen nach Beginn der AAT Inhalation signifikant.

Für IL-1 β im IS ergaben sich folgende Befunde:

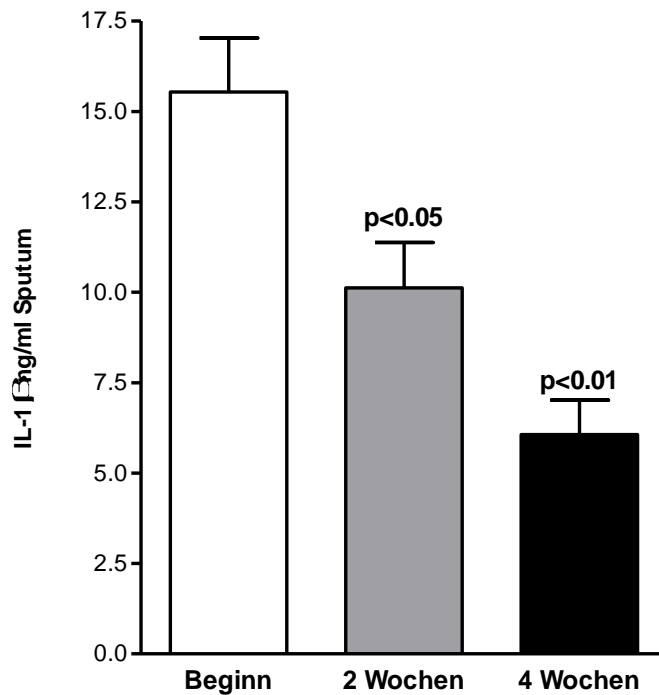


Abbildung 7: IL- 1 β im Sputumüberstand vor Behandlungsbeginn, sowie nach zwei und vier Wochen AAT Inhalation.

Für IL-8 im IS ergaben sich folgende Befunde:

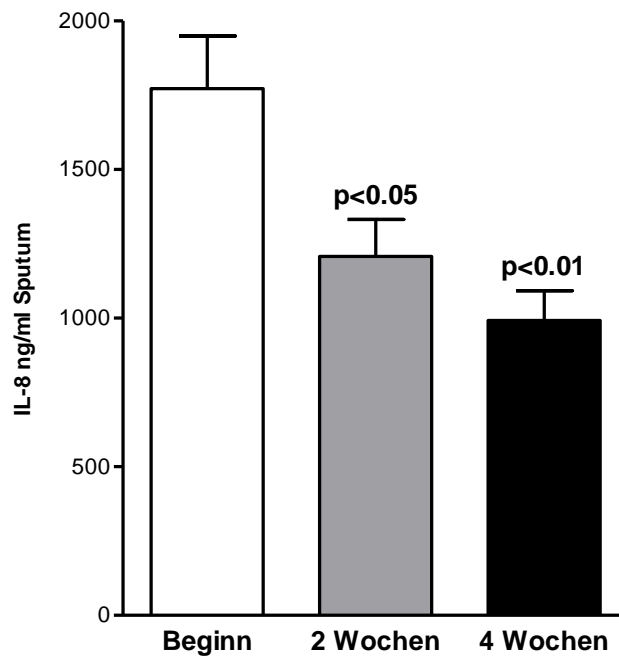


Abbildung 8: IL- 8 im Sputumüberstand vor Behandlungsbeginn, sowie nach zwei und vier Wochen AAT Inhalation.

4.7 Korrelationen

Bei der Korrelation der NE mit den IL-8 Spiegeln ergaben sich folgende Befunde:

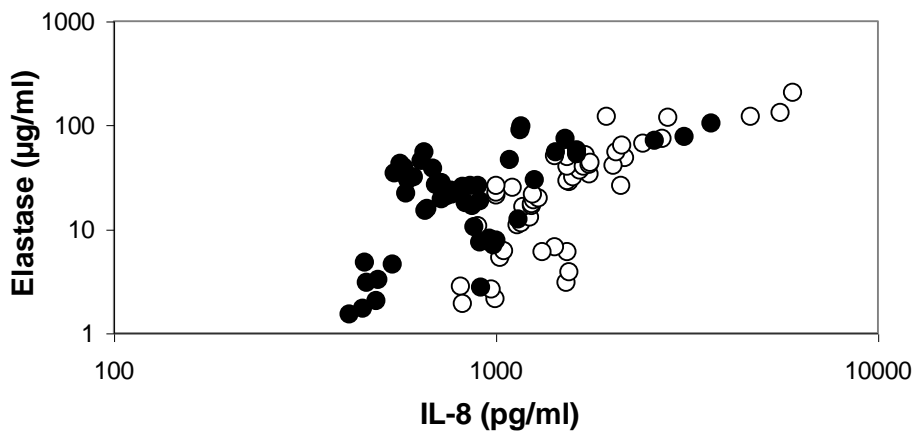


Abbildung 9: Korrelation der freien Elastase mit den IL- 8 Spiegeln. (Weiße Kreise: vor AAT Therapie; Schwarze Kreise: nach AAT Therapie)

Die NE Aktivität korrelierte positiv mit den IL-8 Spiegeln. Dies deutet darauf hin, dass die NE proinflammatorisch im Sinne der IL-8/NG Entzündungsreaktion wirkt. Die Markierung der Kreise zeigt, dass die AAT Therapie zu einer Abnahme der IL-8 Konzentrationen führte.

Bei der Korrelation der IL-8 Spiegel mit den prozentualen Anteilen der NG ergaben sich folgende Befunde:

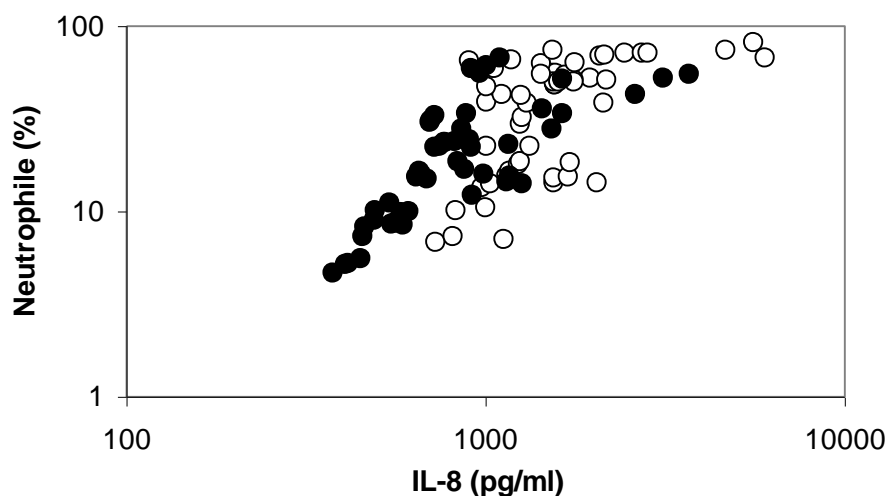


Abbildung 10: Korrelation der IL-8 Spiegel mit den prozentualen Anteilen der NG. (Weiße Kreise: vor AAT Therapie; Schwarze Kreise: nach AAT Therapie)

Die Prozentsätze der NG korrelierten positiv mit den IL-8 Spiegeln. Dies unterstreicht die zentrale Rolle von IL-8 als Chemokin, welches NG rekrutiert.

Bei der Korrelation der prozentualen Anteile der NG mit der NE ergaben sich folgende Befunde:

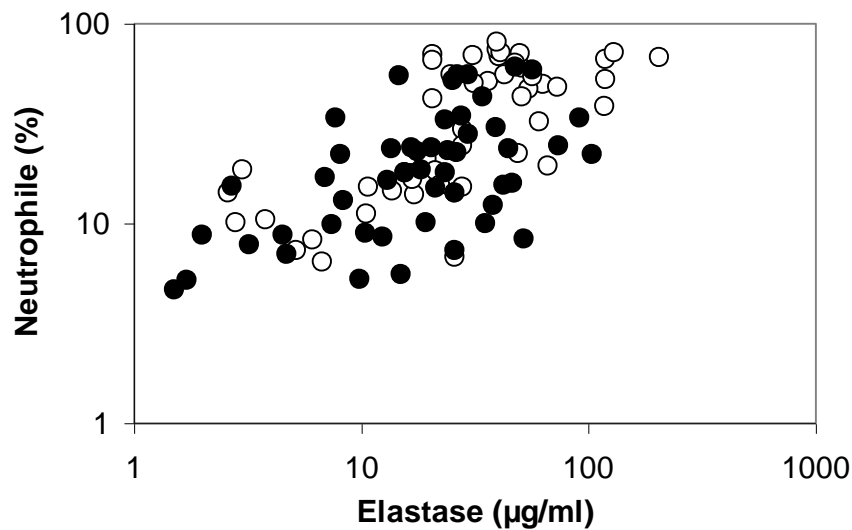


Abbildung 11: Korrelation der prozentualen Anteile der NG mit der freien Elastase

Die Prozentsätze der NG korrelierten positiv mit der NE Aktivität. Dies unterstreicht den Zusammenhang zwischen NG Akkumulation und NE Aktivität (mit NG als Quelle der NE).

5. Diskussion

Ziel dieser Studie war es zu untersuchen, ob die Inhalation von AAT für 4 Wochen in CF Patienten die neutrophile Inflamationsreaktion in den Atemwegen reduzieren kann. Die Inhalation mit AAT führte zu einer Abnahme der Prozentsätze der NG und der proinflammatorischen Zytokine. Diese Befunde deuten darauf hin, dass AAT bei CF Patienten antiinflammatorisch wirken und so den Krankheitsverlauf günstig beeinflussen könnte.

5.1 Einfluss von DTT und Verarbeitungszeit

Die präanalytische Vorbehandlung mit DTT ist für die Lösung des Mucus im IS unabdingbar. Aufgrund seiner reduzierenden Eigenschaften könnte DTT die dreidimensionale Proteinstruktur der Oberflächenmarker, die über Disulfidbrücken aufrechterhalten wird, beeinflussen. Dies würde zu falschen durchflusszytometrischen Messungen führen. Wir fanden in unseren Proben keinen Einfluss von DTT auf die Expression der untersuchten NG Rezeptoren. Eine Studie hingegen fand für einige Marker eine veränderte Fluoreszenzintensität nach Behandlung mit DTT⁵⁴. Allerdings wurden diese Proben aus dem PB gesunder Patienten gewonnen. Eine weitere Studie fand in DTT behandeltem IS eine höhere Gesamtzellzahl als in rein PBS behandeltem IS³⁷. In unseren Ergebnissen fand sich zudem kein Hinweis für einen Einfluss der Verarbeitungszeit. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen einer Studie, die IS von 30 Asthmatikern untersuchte³⁶. Sowohl für die sofortige Weiterverarbeitung innerhalb von 2 Stunden, als auch für eine verzögerte nach 9 bzw. 18 Stunden, ergaben sich keinerlei signifikanten Veränderungen der Gesamt- und Differentialzellzahl in dieser Studie. Die Ergebnisse einer weiteren Studie für innerhalb von 24, bzw. nach 48 bis 72 Stunden untersuchte IS Proben, ergaben ebenfalls keinerlei Auffälligkeiten bezüglich einer zeitlichen Beeinflussung der Weiterverarbeitung der Proben⁴³. Diese Daten deuten darauf hin, dass die Sputumanalyse mit Hilfe von DTT eine reliable Methode zur Analyse der hier untersuchten NG Rezeptoren darstellt.

5.2 Alpha-1-Antitrypsin und neutrophile Elastase

Die NE ist verantwortlich für die Hydrolysierung von Bindegewebsproteinen der Lungenmatrix und damit der Entwicklung eines Lungenemphysems, sowie der progressiven Zerstörung der Lungenstruktur mit Bronchiektasen, wie sie bei CF Patienten beobachtet werden. Bei gesunden Patienten wird die Autodigestion der Lunge durch die lokale Antiproteasenaktivität, vornehmlich durch AAT, verhindert⁵². Mehrere Untersuchungen ergaben auffallend erhöhte aktive NE Werte im CF-Sputum^{40;66;86}. Patienten mit chronischer

Bronchitis wiesen ebenfalls NE im IS auf. Dies zeigt, dass freie proteolytische Aktivität, im Sinne einer Protease/Antiprotease-Dysbalance, kein CF spezifisches Phänomen darstellt, sondern generell im Rahmen chronisch entzündlicher Lungenerkrankungen auftreten kann. Untersuchungen von CF Patienten ab 12 Jahren, die relativ symptomfrei waren und kein IS produzierten, wiesen in der BALF hohe Konzentrationen von aktiver NE auf⁴⁷. In einer vorangegangenen Studie führte eine einwöchige AAT Inhalation- mit täglich zweimaliger Dosis zwischen 1,5 und 3,0 mg/kg - bei CF Patienten mit moderater respiratorischer Schädigung, zu einer vollständigen Inhibition der NE Aktivität in ELF bei einer AAT Konzentration von mindestens 8 $\mu\text{mol/l}$ ⁵⁹. Hingegen nicht vollständig neutralisiert werden konnte die NE im IS durch AAT Inhalation in einer anderen Studie⁵⁸. In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass unter Anwesenheit von AAT *in vivo* kein Effekt auf die IL-8 Freisetzung durch LPS nachweisbar war⁶⁵. Weitere, Placebo-kontrollierte Studien zum Effekt der AAT Inhalation bei CF Patienten scheinen notwendig, da einige der in der aktuellen Studie beobachteten Effekte unspezifisch sein könnten.

5.3 Neutrophile Granulozyten

Die NG spielen eine zentrale Rolle bei akuten nichtinfektiösen und bakteriellen Entzündungen, sowie der Phagozytose von opsonisierten Mikroorganismen, virusinfizierten Zellen, Tumorzellen und anderen körperfremden Antigenen. Das Hauptmerkmal des Entzündungsgeschehens bei CF ist ein ausgeprägter, persistierender Einstrom von NG in die Atemwege, vermittelt durch körpereigene und bakterielle Stoffe. Dies unterstreicht das Ergebnis einer Studie, die eine permanente, von NG dominierte Entzündung der Atemwege bei CF Patienten nachwies⁴⁷. Dabei kennzeichnete auch Patienten mit mildem Krankheitsverlauf, ohne klinische Exazerbation, eine hohe Zahl an NG in den Atemwegen, was die frühzeitige Chronifizierung der Inflammation bei CF verdeutlicht. Studien bei Asthmatikern zeigten unter dem Einfluss von Endotoxin (LPS) und Ozon eine ausgeprägte Neutrophilenreaktion^{1;2}. In einem Mausmodell wurde nach intranasaler LPS Gabe ebenfalls eine starke NG Einwanderung in die Atemwege beobachtet²⁵. Unter den Vermittlern des chronischen NG Einstromes finden sich lösliche Bakterienprodukte, Fragmente der Komplementkaskade und zelluläre Produkte wie LTB₄ und IL-8^{33;45;46}. Bei der Untersuchung der IS Proben unserer Patienten war eine positive Korrelation der IL-8 Spiegel und der prozentualen Anteile der NG festzustellen. Dies hebt die zentrale Rolle von IL-8 als Chemokin, das NG rekrutiert, hervor. Hohe IL-8 Spiegel und proinflammatorische Zytokine wie z.B. TNF- α , halten den Einstrom von NG in die Atemwege aufrecht und führen dort zu

deren Anhäufung. So konnte in einer Studie durch die Hemmung der Aktivität von $\text{TNF-}\alpha$ und IL-8, in CF BALF eine erniedrigte NE Sekretion beobachtet werden⁸⁷. Das lässt den Schluss zu, dass beide eine signifikante Rolle bezüglich der Expression und Aktivierung von NG und damit auch der Freisetzung von NE bei der CF spielen. In den von uns untersuchten IS Proben korrelierten die Zahl der NG positiv mit der Aktivität der NE. Daraus lässt sich ein direkter Zusammenhang zwischen der Akkumulation der NG und der Aktivität der NE ableiten. Die Zahl der NG spielt demnach eine Hauptrolle bei der Entstehung und Persistenz der neutrophilen Entzündungsreaktion bei CF und steht daher im Fokus einer antiinflammatorischen Strategie. Die Untersuchung unserer IS Proben zeigte vier Wochen nach Beginn der Inhalation mit AAT eine signifikante Abnahme der prozentualen Anteile der NG. Dies steht im Einklang mit den in einem Rattenmodell mit chronischer *P.aeruginosa* Lungeninfektion gefundenen Ergebnissen²⁴. Dort führte AAT zu einer Abnahme der Zahl der NG, sowie der Bakterienzahl. Dies unterstreicht augenscheinlich den antiinflammatorischen Effekt von AAT. Eine Studie, die ebenfalls eine Reduktion der NG zum Ziel hatte, fand nach zehntägiger Behandlung von CF Patienten mit Ibuprofen, bei mittleren Plasmakonzentrationen von 50-100 $\mu\text{g/ml}$ einen deutlichen Rückgang der NG Migration⁴⁸. Die Ergebnisse unserer Studie für AAT verdeutlichen gleichfalls die zentrale Bedeutung einer antiinflammatorischen Strategie in der Therapie der CF Patienten.

5.4 CD11b

Adhäsionsmoleküle auf den NG ermöglichen es diesen sich im Blut den Endothelzellen anzuhaften und so aus den Kapillaren in das Gewebe überzutreten. Die Leukozytenadhäsion an die Endothelzellen der postkapillären Venulen wird durch die Expression der Adhäsionsmoleküle auf der Zelloberfläche mitkoordiniert. Für die Leukozytenadhäsion an das Gefäßendothel mitverantwortlich sind vor allem die β -Integrine mit der gemeinsamen α -Kette CD18. Hauptverantwortlich für die Vermittlung der Adhäsionsfunktion ist das Leukozyten-Integrin CD11b/CD18 (= Complement receptor CR3)³⁵. Es konnte gezeigt werden, dass Abnormalitäten dieses Komplexes mit bedeutsamen Infektionen einhergehen⁵¹. CD11b ist normalerweise in geringer Zahl auf der Zelloberfläche unstimulierter NG exprimiert⁶¹. Nach Exposition durch Pathogene kommt es zu einer raschen Zunahme von CD11b aus einem großen intrazellulären Pool der NG, die CD11b als Antwort auf ein inflammatorisches Signal rasch externalisieren und auf ihrer Oberfläche exprimieren^{39;53;56;83;93}. Eine Vielzahl von Studien belegt eine erhöhte Expression von CD11b im Zuge entzündlicher Erkrankungen. So zeigten Untersuchungen von Asthmatikern und

gesunden Patienten eine erhöhte CD11b Expression auf NG im IS⁴². Da sich keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen zeigten, könnte die Erhöhung auf die Migration der NG in das Gewebe zurückzuführen sein. Eine erhöhte CD11b Expression wurde ebenso im IS von Patienten mit Asthma und COPD nachgewiesen⁷⁰. Hierbei kann die Erhöhung zum Teil auf den Einfluss von DTT⁵⁷ und zum Teil auf die physiologische Erhöhung dieses Markers nach Extravasation zurückzuführen sein⁷². Untersuchungen bei Neugeborenen zeigten bei allen Kindern mit klinisch bestätigter Infektion eine erhöhte CD11b Expression⁹¹. Keinerlei Veränderung der CD11b Expression fand man dagegen bei Frühgeborenen⁹⁰. Bei Patienten mit aggressiver Parodontitis war auf den Leukozyten im PB gleichfalls eine erhöhte CD11b Expression nachweisbar⁶⁹. Gleiches zeigte sich bei Patienten mit chronischem Gelenkrheumatismus in der Synovialflüssigkeit⁸. Eine Untersuchung der CD11b Expression bei Patienten mit durch Graspollen induzierter allergischer Rhinitis ergab ebenso eine deutliche Zunahme auf NG nach Migration aus der Blutbahn in die Nasenschleimhäute⁴⁴. Bei Ozonexposition konnte dagegen kein Einfluss auf die CD11b Expression zirkulierender NG nachgewiesen werden¹. Die äußerst schnelle Aktivierung macht CD11b zu einem hervorragenden Früherkennungsmarker für Infektionen^{50;68;83;93}. Dabei wird die Expression und Funktion von CD11b direkt beeinflusst durch die Präsenz von Entzündungsmediatoren wie z.B. Zytokine (TNF- α , IL-8), Fettstoffwechselprodukte (PAF, LTB₄), Anaphylatoxin C5a und bakterielle Produkte (FMLP)⁵. Eine erhöhte CD11b Expression auf NG wurde in mehreren Studien für PAF⁹², FMLP⁷⁷, TNF- α und IL-8⁹⁴ nachgewiesen. Wir fanden in unserer Studie für TNF- α , LTB₄ und auch IL-8 erniedrigte Spiegel nach AAT Inhalation. Dies unterstreicht die Bedeutung der proinflammatorischen Zytokine in der Proteasen/Antiproteasen-Balance. Durch die Inhalation von AAT konnte eine Verschiebung dieses Ungleichgewichtes zu Gunsten der Antiproteasen und somit eine signifikante Reduktion der Entzündung der Atemwege der untersuchten CF Patienten erreicht werden. Dabei spielte es eine untergeordnete Rolle, ob das AAT von den CF Patienten im peripheren oder im bronchialen Inhalationsmodus eingeatmet wurde. Welchen Einfluss die Art der Probengewinnung auf den CD11b Spiegel hat, war ebenfalls Gegenstand einiger Studien. Eine mit Hilfe der Durchflusszytometrie durchgeführte Untersuchung von IS, sowie BAL- und PB-Proben³ gesunder Patienten, kam zu folgendem Ergebnis: IS- Monozyten zeigten eine höhere CD11b Expression als PB- und BAL-Monozyten. Aufgrund der Auseinandersetzung der bronchialen Atemwege mit Umweltpartikeln und infektiösen Mikroorganismen sind Zellen dieses Kompartiments funktionell aktiver. Da CD11b als ein Hauptoberflächenrezeptor die Komplement-assoziierte

Phagozytose vermittelt, könnte die Erhöhung von CD11b eine erhöhte funktionelle Aktivierung aufgrund der kontinuierlichen Auseinandersetzung des Organismus mit inhalierten Mikroorganismen in den oberen Atemwegen reflektieren. In einer Studie bei Asthmatikern hingegen, war die Oberflächenexpression von CD11b auf IS- und zirkulierenden Phagozyten, nach Exposition mit inhaliertem Endotoxin (LPS) signifikant erniedrigt². Ebenfalls erniedrigt war die CD11b Expression bei Probanden, die eine Stunde lang ein moderates bzw. hochintensives Training auf einem Laufband absolvierten⁶⁷. Ein Grund für die CD11b Erniedrigung könnte die Rezepterspaltung von der Zellmembran der NG durch proteolytische Enzyme darstellen. Mehrere Studien zeigten eine proteolytische Spaltung an den CD11b Rezeptoren nach *in vitro* Inkubation von NG mit Enzymen, die den bei der Degranulation von NG freigesetzten Enzymen ähnelten^{12;27;79}. Dies könnte Teil eines regulatorischen Kontrollkreises sein, der eine exzessive NG Aktivierung und Infiltration verhindern soll. Wir konnten in unserer Studie zeigen, dass durch die Inhalation von AAT die CD11b Expression auf NG nach 2 und 4 Wochen signifikant abnahm. Durch die antiinflammatorische Wirkung von AAT konnte eine verminderte Aktivierung der NG in den CF Atemwegen erreicht werden. Die Entzündungshemmung als wichtiger Angriffspunkt einer medikamentösen Beeinflussung der neutrophilen Entzündungsreaktion wird in einer weiteren Studie belegt. Nach Behandlung mit Dexamethason konnte ebenso eine erniedrigte Expression von CD11b auf NG bei Neugeborenen mit bronchopulmonaler Dysplasie beobachtet werden¹¹. Unsere Ergebnisse weisen auf eine Rolle von CD11b auf NG in der Inflammation, sowie dem Proteasen/Antiproteasen-Gleichgewicht bei CF hin. Die Rolle von CD11b auf NG bei CF bedarf weiterer Studien.

5.5 Proinflammatorische Zytokine/ Lipidmediatoren

Neuere Studien weisen auf eine Rolle von AAT als antiinflammatorischer Regulator hin, die unabhängig von der Rolle als Antiprotease ist⁶⁵. Man beobachtete eine dosisabhängige Inhibition der LPS-stimulierten Freisetzung von TNF- α und IL-1 β durch Monozyten, sowie von IL-8 durch NG *in vitro*. Bei der Rekrutierung von NG an den Ort des Entzündungsgeschehens spielen Chemokine eine zentrale Rolle^{9;89}. Unter den Chemokinen die für die Chemotaxis der NG verantwortlich zeichnen, ist IL-8 der signifikanteste und am besten beschriebene Aktivierungs- und Chemotaxisfaktor⁹⁵. Es hat dabei einen direkten Effekt auf die Reifung, Migration und Aktivierung der NG^{10;63;76}. In den von uns untersuchten Proben zeigte sich ein signifikanter Rückgang von IL-8 im IS, was auf einen

antiinflammatorischen Effekt von AAT hinweist. Die Abnahme der IL-8 Spiegel im IS ist eine mögliche Erklärung für die Abnahme der NG im IS nach AAT Therapie.

5.6 Einschränkungen

Eine systematische Einschränkung dieser Studie stellt das Fehlen einer Placebo-kontrollierten Kontrollgruppe dar. Ein Grund für das Fehlen einer ausgeprägten Signifikanz zwischen den Ergebnissen vor und nach Inhalation mit AAT könnte in der relativ geringen Anzahl der Probanden liegen. Aufgrund der festgelegten Ein- und Ausschlusskriterien musste die Studienteilnehmerzahl während der Behandlungsphase mehrmals reduziert werden. Da in den klinischen Ergebnissen ebenfalls die erwartete deutliche Veränderung der Lungenfunktion - unter anderem für FEV₁ - ausblieb, ist in neueren Studien vermutlich eine Behandlung der Patienten mit einer höheren AAT Dosis, eventuell auch über einen längeren Zeitraum notwendig. Die Ergebnisse für die NE in den IS Proben unterlagen größeren Unterschieden, als wir es aus den Ergebnissen anderer wissenschaftlicher Studien erwartet hätten^{32;34}. Dies lag sowohl an der inter-, als auch an der intraindividuellen Variabilität der Patientendaten. Zurückgeführt werden kann dies wahrscheinlich auf das zu untersuchende Probenmaterial: IS. Im BAL Überstand werden durch Filtration Zellbruchstücke entfernt. Im IS sind zahlreiche beschädigte und abgestorbene NG vorhanden, die unter anderem auch große Mengen an NE enthalten. Dies könnte vermutlich zu einem höheren Spiegel an NE im IS führen. Ebenso möglich wäre die Freisetzung von intrazellulärer Elastase in den Sputumüberstand durch Manipulationen an den IS Proben während der Aufbereitung, beispielsweise durch Mischen und Zentrifugieren. Daher könnte, verglichen mit dem BAL Überstand, vermutlich eine höhere Antiproteasenkonzentration im IS nötig sein, um die Proteasen vollständig neutralisieren zu können⁵⁹. Obwohl diese Beobachtungen auf den ersten Blick für BAL als Mittel der Wahl zur Untersuchung der Effekte durch die Antiproteasentherapie sprechen, gilt es zu bedenken, dass BALF eher ein peripheres Lungenkompartiment reflektiert, wohingegen die CF Lungenerkrankung hauptsächlich auf das bronchiale Lungenkompartiment begrenzt ist. Des Weiteren sind NE und NG, im Vergleich mit BAL, im IS von CF Patienten reichlicher vorhanden^{73;74}. Weitere Studien sind notwendig, um die Wertigkeit von IS in Studien zur Inflammation und antiinflammatorischen Therapie bei CF Patienten besser beurteilen zu können.

5.7 Pathophysiologisches Modell

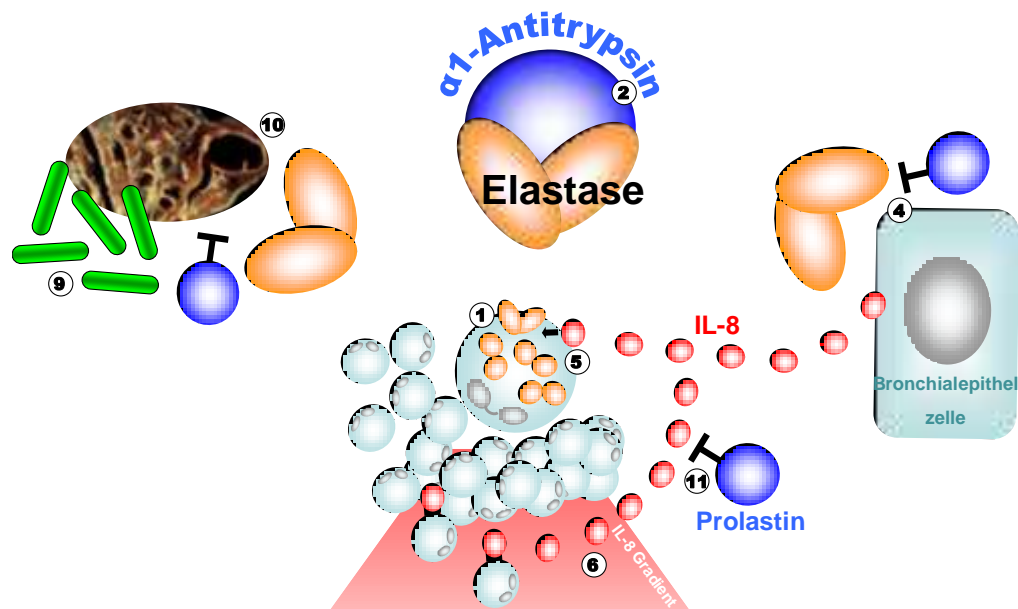


Abbildung 12:

Auswirkung und Bedeutung von AAT als Schutzmechanismus bei CF:

neutrophile Elastase Bindung (2), Hemmung der IL-8 Genexpression in Bronchialepithelzellen(4) und der lokalen IL-8 Freisetzung (6/11). P.aeruginosa Abtötung (9), Hemmung der NG Aktivierung und Freisetzung der neutrophilen Elastase (1/5) als Schutz vor proteolytischer Lungengewebsdestruktion (10).

Nach Stimulation mittels IL-8 setzen NG in den Atemwegen NE frei, welche durch AAT neutralisiert werden kann. Aufgrund des Ungleichgewichtes zwischen AAT und NE bei CF Patienten, führen zahlreiche proteolytische Schädigungen zu Bronchiektasien und Lungengewebszerstörung. Die Fähigkeit zur bakteriellen Abwehr wird durch die Spaltung des Komplementrezeptors 1 auf NG reduziert. Die geschädigte Abwehr führt zu einer erhöhten Bakterienzahl, darunter insbesondere *P.aeruginosa*, welche wiederum das Lungengewebe schädigt. Darüber hinaus triggert die NE die IL-8 Produktion durch Bronchialepithelzellen. Die Freisetzung von IL-8 durch die Epithelzellen führt zu einer vermehrten Rekrutierung von NG aus der Zirkulation in den Alveolarraum. Eine exogene AAT Zufuhr könnte zu einer

Abmilderung dieses Prozesses führen. Außerdem könnte AAT, neben seiner Wirkung als Antiprotease, durch eine Reduktion der Spiegel an freiem IL-8 eine antiinflammatorische Wirkung besitzen. Aufgrund dessen könnte die Inhalation von AAT dazu beitragen, den Teufelskreislauf der progressiven Entzündung der Atemwege bei CF Patienten zu durchbrechen.

6. Zusammenfassung

Um den Effekt der Inhalation von Alpha-1-Antitrypsin bei Patienten mit CF zu untersuchen, führten wir bei insgesamt 52 CF Patienten eine Studie durch. Die therapeutische Bedeutung der Alpha-1-Antitrypsin Inhalation bei CF Patienten wurde dabei anhand mehrerer Parameter bestimmt. Da die CF charakterisiert wird durch eine ausgeprägte Entzündung in den Lungen, wurde besonderes Augenmerk auf die CF kennzeichnenden Entzündungsfaktoren gelegt. So zeigte die tägliche Inhalation mit 25 mg Alpha-1-Antitrypsin Auswirkung auf die neutrophilen Granulozyten, die in der Lunge der CF Patienten deutlich erhöht sind. Die Zahl der neutrophilen Granulozyten im induzierten Sputum sank zwei und vier Wochen nach Inhalation signifikant. Die Sputumproben zeigten nach Inhalation mit Alpha-1-Antitrypsin eine Verminderung der neutrophilen Elastase, die in der Lunge von CF Patienten hauptverantwortlich für die Zerstörung des Lungengewebes ist. Es zeigte sich daneben auch ein direkter antiinflammatorischer Effekt durch eine Hemmung der IL-8 Freisetzung. IL-8 triggert den Neutrophileneinstrom in die Lunge und fördert dort die Freisetzung der neutrophilen Elastase. Neben einer Abnahme von IL-8 führte die Inhalation von Alpha-1-Antitrypsin ebenfalls zu einer Abnahme der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , TNF- α und LTB $_4$. Bei der durchflusszytometrischen Untersuchung der Sputumproben war der Hauptentzündungsmarker CD11b im Vergleich zu Studienbeginn, nach zwei beziehungsweise vier Wochen geringer exprimiert. Er spielt bei der Adhäsion, Diapedese und Phagozytose der neutrophilen Granulozyten eine bedeutende Rolle. Keinerlei signifikante Änderungen konnten bezüglich der Lungenfunktion festgestellt werden. Vermindert zeigte sich hingegen die Zahl an *Pseudomonas aeruginosa* in den untersuchten Sputumproben nach Inhalation mit Alpha-1-Antitrypsin.

Aus diesen Ergebnissen lassen sich folgende Aussagen ableiten:

- Mit Hilfe der Durchflusszytometrie und der verwendeten Analyseverfahren, ließ sich nach vierwöchiger Inhalation von Alpha-1-Antitrypsin eine signifikante Abnahme der neutrophilen Granulozyten im induzierten Sputum von CF Patienten nachweisen.
- Die Spiegel der proinflammatorischen Mediatoren IL-8, IL-1 β , TNF- α und LTB $_4$ im induzierten Sputum der CF Patienten, sanken nach zwei- und vierwöchiger Alpha-1-Antitrypsin Inhalation signifikant. Dabei hatte die Vorbehandlung der Sputumproben mit Sputolysin keinen signifikanten Einfluss auf die Ergebnisse.

- Die Expression, des für die Lungenerkrankung bei CF charakteristischen Oberflächenmarkers CD11b auf den neutrophilen Granulozyten im induzierten Sputum von CF Patienten, sank nach zwei- und vierwöchiger Inhalation von Alpha-1-Antitrypsin signifikant.
- Die Inhalation von Alpha-1-Antitrypsin scheint trotz einer fehlenden Verbesserung der Lungenfunktion eine deutliche Milderung der Entzündung in den Atemwegen von CF Patienten zu bewirken

7. Anhang

7.1 Literaturverzeichnis

1. Alexis, N., S. Becker, P.A. Bromberg, R. Devlin, P.B. Peden. 2004. Circulating CD11b expression correlates with the neutrophil response and airway mCD14 expression is enhanced following ozone exposure in humans. *Clinical Immunology* 111: 126-131
2. Alexis, N., M. W. Eldrige, D. B. Peden. 2003. Effect of inhaled endotoxin on airway and circulating inflammatory cell phagocytosis and CD11b expression in atopic asthmatic subjects. *J. Allergy Clin Immunol.* Aug.112(2):353-61.
3. Alexis, N., J. Soukup, A. Ghio, S. Becker. 2000. Sputum phagocytes from healthy individuals are functional and activated: A flow cytometric comparison with cells in bronchoalveolar lavage and peripheral blood. *Clinical Immunology* 97:21-32.
4. Allen, E. D. 1996. Opportunities for the use of aerosolized alpha 1-antitrypsin for the treatment of cystic fibrosis. *Chest.* 110:256S-260S
5. Allen, R.C., D.L. Stevens. 1992. The circulating phagocyte reflects the in vivo state of immune defense. *Curr.Opin.Infect.Dis.* 5:389-98
6. Anderson, D.C., L.J. Miller, F.C. Schmalstieg, R. Rothlein, T.A. Springer. 1986. Contributions of the Mac-1 glycoprotein family to adherence-dependent granulocyte functions: structure-function assessments employing subunit-specific monoclonal antibodies. *J.Immunol.* 137:15-27
7. Atzeni, F., M. Schena, A.M. Ongari, M. Carrabba, P. Bonara, F. Minonzio, F. Capsoni. 2002. Induction of CD69 activation molecule on human neutrophils by GM-CSF, IFN-gamma, and IFN-alpha. *Cellular Immunology* 220:20-29
8. Atzeni, F., N. Del Papa, P. Sarzi-Puttini, F. Bertolazzi, F. Minonzio, F. Capsoni. 2004. CD69 expression on neutrophils from patients with rheumatoid arthritis. *Clinical and Experimental Rheumatology* 22:331-334
9. Baggiolini, M. 1998. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 392:565-568
10. Baggiolini, M. A. Walz, S.L. Kunkel. 1989. Neutrophil activating peptide-1/interleukin-8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J.Clin.Invest.* 84:1045-1049

11. Ballabh, P., M. Simm, J. Kumari, A. N. Kraus, A. Jain, C. Califano, M.L. Lesser, S. Cunningham-Rundles. 2004. Neutrophil and monocyte adhesion molecules in bronchopulmonary dysplasia, and effects of corticosteroids. *Archives of disease in childhood* 89: F76-F83
12. Bazil, V., J. Strominger. 1994. Metalloprotease and serine protease are involved in cleavage of CD43, CD44 and CD16 from stimulated human granulocytes. Induction of cleavage of L-selectin via CD16. *J.Immunol.* 152:1314-1322
13. Belda, J., R. Leigh, K. Parameswaran, P.M. O'Byrne, M.R. Sears, F.E. Hargreave. 2000. Induced sputum cell counts in healthy adults. *Am.J.Respir.Crit.Care Med* 161:475-478
14. Berger, M. 1991. Inflammation in the lung in cystic fibrosis- A vicious cycle that does more harm than good. *Clinical Reviews in Allergy* 9:119-142
15. Berger, M., J. O'Shea, A.S. Cross, *et al.* 1994. Human neutrophils increase expression of C3bi as well as C3b receptors upon activation. *J.Clin.Invest.* 74:1566-1571
16. Berger, M., R.U. Sorensen, M.F. Tosi, D.G. Dearborn, G. Döring. 1989. Complement receptor expression on neutrophils at an inflammatory site, the *Pseudomonas*-infected lung in cystic fibrosis. *J.Clin.Invest.* 84: 1302-1313
17. Birrer, P. 1995. Proteases and antiproteases in cystic fibrosis: pathogenetic considerations and therapeutic strategies. *Respiration* 62 Suppl 1:25-28
18. Birrer, P., N. G. McElvaney, A. Rudeberg, C. W. Sommer, S. Liechti-Gallati, R. Kraemer, R. Hubbard, R. G. Crystal. 1994. Protease-antiprotease imbalance in the lungs of children with cystic fibrosis. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 150:207-213
19. Birrer P., NG McElvaney, A. Rudeberg, *et al.* 1994. Protease-antiprotease imbalance in the lungs of children with cystic fibrosis. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 150:207-13

20. Bonfield, T.L., J.R. Panuska, M.W. Konstan, *et al.* 1995. Inflammatory cytokines in cystic fibrosis lung. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 152:2111-2118
21. Bretz, U., M. Baggiolini. 1974. Biochemical and morphological characterization of azurophil and specific granules of human neutrophil polymorphonuclear leukocytes. *J.Cell.Biol.* 63:251-269
22. Bruce, M.C., L. Poncz, J.D. Klinger, R.C. Stern, J.F. Tomashefski, D.G. Dearborn. 1985. Biochemical and pathologic evidence for proteolytic destruction of lung connective tissue in cystic fibrosis. *Am.Rev.Respir.Dis.* 132:529-535
23. Campanelli, D., P.A. Detmers, C.F. Nathan, J.E. Gabay. 1990. Azurocidin and a homologous serine protease from neutrophils, differential microbial and proteolytic properties. *J.Clin.Invest.* 85:904-915
24. Cantin, A., D. E. Woods. 1999. Aerolized Prolastin suppresses bacterial proliferation in a model of chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 160:1130-1135
25. Chignard, M., V. Balloy. 2000. Neutrophil recruitment and increased permeability during acute lung injury induced by lipopolysaccharide. *Am.J.Physiol.Lung.Cell.Mol.Physiol.* 279:1083-1090
26. Chmiel, J.F., P.B. Davis. 2003. State of the art: why do the lungs of patients with cystic fibrosis become infected and why can't they clear the infection? *Respir.Res.* 4:8
27. Davey, P.C., M. Zuzel, A.S. Kamiguti, J.A. Hunt, K.A. Aziz. 2000. Activation-dependent proteolytic degradation of polymorphonuclear CD11b. *Br.J.Haematol.* 111:934-942
28. Davies, J.C. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: pathogenesis and persistence. *Paediatr.Respir.Rev.* 3(2):128-134

29. Davis, P.B. 2006. Cystic fibrosis since 1938. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 173(5):475-482.
30. Davis, P.B., M. Drumm, M.W. Konstan. Cystic fibrosis: State of the art. 1996. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 154:1229-1256
31. Di Mango, E., H.J. Zar, R. Bryan, A. Prince. 1995. Diverse *Pseudomonas aeruginosa* gene products stimulate respiratory epithelial cells to produce interleukin-8. *J.Clin.Invest.* 96: 2204-2210
32. Döring, G. 1994. The role of Neutrophil elastase in chronic inflammation. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 150:114-117
33. Döring, G., R. Knight, G. Bellon. 1994. Immunology of cystic fibrosis. In: Hodson M., Geddes D., eds. Cystic Fibrosis. London, Chapman & Hall, pp 99-129
34. Döring, G., W. Goldstein, K. Botzenhart, A. Kharazmi, P. O. Schiotz, N. Hoiby, M. Dasgupta. 1986. Elastase from polymorphonuclear leucocytes: a regulatory enzyme in immune complex disease. *Clin.Exp.Immunol.* 59:597-605
35. Doerschuk, C.M., S. Tasaka, O.Wang. 2000. CD11b/CD18-dependent and -independent neutrophil emigration in the lungs. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Bio.* 23 (2) 133-136
36. Efthimiadis, A., L. Jayaram, S.Weston, S. Carruthers, F.E. Hargreave. 2002. Induced sputum: time from expectoration to processing. *Eur. Respir. J.* 19:706-708
37. Efthimiadis, A., M.M.M. Pizzichini, E. Pizzichini, J. Dolovich, F.E. Hargreave. 1997. Induced sputum cell and fluid-phase indices of inflammation: comparison of treatment with dithiothreitol vs. Phosphate-buffered saline. *Eur. Respir. J.* 10:1336-1340
38. Elizur, A., C.L. Cannon, T.W. Ferkol. 2008. Airway inflammation in cystic fibrosis. *Chest* 133(2):489-495.

39. Finn, A., S. Strobel, M. Levin, N. Klein. 1994. Endotoxin-induced neutrophil adherence to endothelium: relationship to CD11b/CD18 and L-selectin expression and matrix disruption. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 725:173-82
40. Goldstein W., G. Döring. 1986. Lysosomal enzymes from polymorphonuclear leukocytes and proteinase inhibitors in patients with cystic fibrosis. *Am.Rev. Respir.Dis.*134:49-56
41. Hubbard R.C., G.Fells, J.Gadek, S.Pacholok, J.Humes, R.G.Crystal. 1991. Neutrophil accumulation in the lung in alpha-1-antitrypsin deficiency. Spontaneous release of leukotriene B₄ by alveolar macrophages. *J.Clin.Invest.* 88:891-897
42. In 't Veen, J.C.C.M., D.C. Grootendorst, E.H. Bel, H.H. Smits, M. Van der Keur, P.J. Sterk, P.S. Hiemstra. 1998. CD11b and L-Selectin expression on eosinophils and neutrophils in blood and induced sputum of patients with asthma compared with normal subjects. *Clinical and Experimental Allergy*, Volume 28, pages 606-615
43. Kelly, M.M., F.E. Hargreave, G. Cox. 2003. A method to preserve sputum for delayed examination. *Eur.Respir.J.* 22:996-1000
44. Kinhult, J., A. Egesten, M. Benson, R. Uddman, L.O. Cardell. 2003. Increased expression of surface activation markers on neutrophils following migration into the nasal lumen. *Clinical and Experimental Allergy* 33:1141-1146
45. Konstan, M.W., M. Berger. 1997. Current understanding of the inflammatory process in cystic fibrosis: Onset and etiology. *Pediatric Pulmonology* 24:137-142
46. Konstan, M.W., M. Berger. 1993. Infection and inflammation in the lung in cystic fibrosis. In: Davis P.B., ed. Cystic fibrosis. New York, Marcel Dekker; pp.219-276
47. Konstan, M.W., K.A. Hilliard, T.M. Norvell, M. Berger. 1994. Bronchoalveolar lavage findings in cystic fibrosis patients with stable, clinically mild lung disease suggest ongoing infection and inflammation. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 150:448-454

48. Konstan, M.W., J.E. Krenicky, M.R. Finney, H.L. Kirchner, K.A. Hilliard, J.B. Hilliard, P.B. Davis, C.L. Hoppel. 2003. Effect of Ibuprofen on Neutrophil Migration in Vivo in Cystic Fibrosis and Healthy Subjects. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 306:1086-1091
49. Kronborg, G., M.B. Hansen, M. Svenson, A. Fomsgaard, N. Høiby, K. Bendtzen. 1993. Cytokines in sputum and serum from patients with cystic fibrosis and chronic Pseudomonas aeruginosa infection as marker of destructive inflammation in the lungs. *Pediatr.Pulmonol.* 15:292-297
50. Lehr, H.A, F. Krombach, S. Munzing, *et al.* 1995. In vitro effects of oxidized low density lipoprotein on CD11b/CD18 and L-selectin presentation on neutrophils and monocytes with relevance for the in vivo situation. *Am.J.Pathol.* 146:218-27
51. Lekstrom-Himes, J.A., J.L. Gallin. 2000. Immunodeficiency diseases caused by defects in phagocytes. *N.Engl. J. Med.* 343:1703-1714.
52. Liebermann J, W. Kaneshiro. 1972. Inhibition of leukocytic elastase from purulent sputum by alpha₁-antitrypsin. *J.Lab.Clin.Med.* 80:88-101
53. Lo, S.K., G.A. van Sventer, S.M. Levin, S.D. Wright. 1989. Two leukocyte receptors (CD11a/CD18 and CD11b/CD18) mediate transient adhesion to endothelium by binding to different ligands. *J.Immunol.* 143 :3325-9
54. Loppow, D., M. Böttcher, G. Gercken, H. Magnussen, R.A. Jörres. 2000. Flow cytometric analysis of the effect of dithiothreitol on leukocyte surface markers. *Eur.Respir.J.* 16:324-329
55. Lucey, E.C., P.J. Stone, R. Breuer, *et al.* 1985. Effect of combined human neutrophil cathepsin G and elastase on induction of secretory cell metaplasia and emphysema in hamsters with in vitro observations on elastolysis by these enzymes. *Am.Rev.Respir.Dis.* 132: 362-366

56. Lynam, E.B., S.I. Simon, Y.P. Rochon, L.A. Sklar. 1994. Lipopolysaccharide enhances CD11b/CD18 function but inhibits neutrophil aggregation. *Blood*. 83:3303-11
57. Mackarel, A.J., K.J. Russell, C.S. Brady, M.X. FitzGerald, C.M. O'Connor. 2000. Interleukin-8 and leukotriene-B(4), but not formylmethionyl leucylphenylalanine, stimulate CD18-independent migration of neutrophils across human pulmonary endothelial cells in vitro. *Am.J.Respir.Cell.Mol.Biol*. 23:154-61
58. Martin,S.L., D. Downey, D. Bilton, M.T. Keogan, J. Edgar, J.S. Elborn. 2006. Safety and efficacy of recombinant alpha₁-antitrypsin therapy in cystic fibrosis. *Pediatr.Pulmonol*. 41:177-183
59. McElvaney, N.G., R.C. Hubbard, P. Birrer, M.S. Chernick, D.B. Caplan, M.M. Frank, R.G. Crystal. 1991. Aerosol alpha₁-antitrypsin treatment for cystic fibrosis. *Lancet*. 337:392-394
60. McElvaney, N.G., R. Hubbard, G. Fells, *et al*. 1990. Intravenous α_1 -antitrypsin therapy to reestablish anti-neutrophil elastase defenses of the pulmonary epithelial surface in cystic fibrosis. *Am.Rev.Respir.Dis*. 140:A83
61. Miller, L.J., D.F. Bainton, N. Borregaard, T.A. Springer. 1987. Stimulated mobilization of monocyte Mac-1 and p150,95 adhesion proteins from an intracellular vesicular compartment to the cell surface. *J.Clin.Invest*. 80:535-44
62. Moskowitz, S.M., R.L. Gibson, E.L. Effmann. 2005. Cystic fibrosis lung disease: genetic influences, microbial interactions, and radiological assessment. *Pediatr.Radiol*. 35(8):739-757.
63. Nakamura, H., K. Yoshimura, H.A. Jaffe, *et al*. 1991. Interleukin-8 gene expression in human bronchial epithelial cells. *J.Biol.Chem*. 266:19611-19617

64. Nakamura, H., K. Yoshimura, N.G. McElvaney, R.G. Crystal. 1992. Neutrophil elastase in respiratory epithelial lining fluid of individuals with cystic fibrosis induces interleukin-8 gene expression in a human bronchial epithelial cell line. *J.Clin.Invest.* 89:1478-1484
65. Nita, I., C. Hollander, U. Westin U., S.M. Janciauskiene. 2005. Prolastin, a pharmaceutical preparation of purified human alpha1-antitrypsin, blocks endotoxin-mediated cytokine release. *Respir.Res.* 6:12
66. O'Connor C.M., K. Gaffney, J. Keane, *et al.* 1993. α_1 -Proteinase inhibitor, elastase activity, and lung disease severity in cystic fibrosis. *Am.Rev.Respir.Dis.* 148:1665-70
67. Peak, J., G. Wilson, M. Hordern, K. Suzuki, K. Yamaya, K. Nosaka, L. Mackinnon, J.S. Coombes. 2004. Changes in neutrophil surface feceptor expression, degranulation, and respiratory burst activity after moderate- and high-intensity exercise. *J.Appl.Physiol.* 97:612-618
68. Pettit, E.J, M.B. Hallett. 1994. Neutrophil activation and priming during engagement of CD11b/CD18 integrins. *Biochem.Soc.Trans.* 22:327S
69. Pietruska, M., J. Žak, J. Pietruski, J. Wysocka. 2005. Expression of selected adhesion molecules on peripheral blood leukocytes in patients with aggressive periodontitis. *Arch.Immunol.Ther.Exp.* 53:266-271
70. Pignatti, P., G. Moscato, S. Casarini, M. Delmastro, M. Poppa, G. Brunetti, P. Pisati, B. Balbi. 2005. Downmodulation of CXCL8/IL-8 receptors on neutrophils after recruitment in the airways. *J.Allergy Clin.Immunol.* 115:88-94
71. Pilewski, J.M., R.A. Frizzell. 1999. Role of CFTR in airway disease. *Physiol. Rev.* 79(1 Suppl):S215-S255.
72. Qiu, D., W.C. Tan. 1999. Dithiothreitol has a close response effect on cell surface antigen expression. *J.Allergy.Clin.Immunol.* 103:873-6

73. Ratjen, F., E. Rietschel, M. Griese, *et al.* 2000. Fractional analysis of bronchoalveolar lavage fluid cytology in cystic fibrosis patients with normal lung function. Brochoalveolar lavage for the evaluation of anti-inflammatory treatment (BEAT) study group. *Eur.Respir.J.* 15:141-145
74. Reinhardt, N., C.I. Chen, D.Loppow, *et al.* 2003. Cellular profiles of induced sputum in children with stable cystic fibrosis: comparison with BAL. *Eur.Respir.J.* 22:497-502
75. Rebuck, N., A. Finn. 1994. Polymorphonuclear granulocyte expression of CD11b/CD18 and L-selectin in normal individuals. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.* 38:1-8
76. Richman-Eisenstat, J.B., P.G. Jorens, C.A. Hebert, *et al.* 1993. Interleukin-8: an important chemoattractant in sputum of patients with chronic inflammatory airway diseases. *Am.J.Physiol.* 264: L413-L418
77. Russell, K.J., J. McDremond, N. Mukherji, C. Costello, V. Keatings, S. Linnane, *et al.* 1998. Neutrophil adhesion molecule surface expression and responsiveness in cystic fibrosis. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 157:756-761
78. Rutgers, S.R., W. Timmens, H.F. Kaufmann, TH. W. van der Mark, G.H. Koëter, D.S. Postma. 2000. Comparison of induced sputum with bronchial wash, bronchoalveolar lavage and bronchial biopsies in COPD. *Eur.Respir.J.* 15:109-115
79. Sadallah, S., C. Hess, S. Miot, O. Spertini, H. Lutz, J.A. Schifferli. 1999. Elastase and metalloproteinase activities regulate soluble complement receptor 1 release. *Eur.J.Immunol.* 29:3754-3761
80. Sagel, S. D., R. Kapsner, I. Osberg, K. Sontag, F.J. Accurso. 2001. Airway inflammation in children with cystic fibrosis and healthy children assessed by sputum induction. *American Journal of Respiratory and critical Care Medicine* 164:1425-1431
81. Simms, H.H., R. D'Amico. 1992. Polymicrobial sepsis disrupts normal neutrophil extracellular matrix protein interactions. *Circ.Shock.* 38:1-8

82. Simms, H.H., R. D'Amico. 1994. Hypoxemia regulates effect of lipopolysaccharide on polymorphonuclear leucocyte CD11b/CD18 expression. *J.Appl.Physiol.* 76:1657-63
83. Simms, H.H., R. D'Amico. 1995. Lipopolysaccharide induces intracytoplasmic migration of the polymorphonuclear leukocyte CE11b/CD18 receptor. *Shock.* 3:196-203
84. Sommerhof, C.P., J.A. Nadel, C.B. Basbaum, G.H. Caughey. 1990. Neutrophil elastase and cathepsin G stimulate secretion from cultured bovine airway gland serous cells. *J.Clin.Invest.* 85:682-689
85. Suter, S., I. Chevallier. 1991. Proteolytic inactivation of alpha 1-proteinase inhibitor in infected bronchial secretions from patients with cystic fibrosis. *Eur.Respir.J.* 4:40-49
86. Suter, S., U.B. Schaad, H. Tegner, *et al.* 1986. Levels of free granulocyte elastase in bronchial secretions from patients with cystic fibrosis: effect of antimicrobial treatment against *Pseudomonas aeruginosa*. *J.Infect.Dis.* 153:902-09
87. Taggart, C., R.J. Coakley, P. Grealley, G. Canny, S.H. O'Neill, N.G. McElvaney. 2000. Increased elastase release by CF neutrophils is mediated by tumor necrosis factor- α and interleukin-8. *Am.J.Physiol.Lung.Cell.Mol.Physiol.* 278:33-41
88. Tegner, H., K. Ohlsson, N.G. Toremalm, C. von Mecklenburg. 1979. Effect of human leukocyte enzymes on tracheal mucosa and its mucociliary activity. *Rhinology* 17:199-206
89. Wang, J.M., S. Su, W. Gong, J.J. Oppenheim. 1998. Chemokines, receptors and their role in cardiovascular pathology. *Int.J.Clin.Lab.Res.* 28:83-90
90. Weinschenk, N.P., A. Farina, D. Bianchi. 2000. Premature infants respond to early-onset and late-onset sepsis with leukocyte activation. *J.Pediatr.* 137:345-350
91. Weirich, E., R.L. Rabin, Y. Maldonado, W. Benitz, S. Modler, L.A. Herzenberg, L.A. Herzenberg. 1998. Neutrophil CD11b expression as a diagnostic marker for early-onset neonatal infection. *The Journal of Pediatrics*, Volume 132, Number 3, Part 1, 445-451

92. Witko-Sarsat, V., L. Halbwachs-Mecarelli, I. Sermet-Gaudelus, G. Bessou, G. Lenoir, R.C. Allen, B. Descamps-Latscha. 1999. Priming of blood neutrophils in children with cystic fibrosis: correlation between functional and phenotypic expression of opsonin receptors before and after platelet-activating factor priming. *The Journal of Infectious Diseases* 179:151-162
93. Witthaut, R., A. Farhood, C.W. Smith, H. Jeschke. 1994. Complement and tumor necrosis factor-alpha contribute to Mac-1 (CD11b/CD18) up-regulation and systemic neutrophil activation during endotoxemia in vivo. *J.Leukoc.Biol.* 55:105-11
94. Wittmann, S., G. Rothe, G. Schmitz, D. Fröhlich. 2004. Cytokine upregulation of surface antigens correlates to the priming of the neutrophil oxidative burst response. *Cytometry Part A* 57A:53-62
95. Wuyts, A., P. Proost, J. Van Damme. 1998. Interleukin-8 and other CXC chemokines. In: Thomson A., editor. *The cytokine handbook*; p.271-311

7.2 Tabellenverzeichnis**Seite**

Tabelle 1.	verwendete Fluorochrome	15
Tabelle 2.	Patientengruppen mit peripherer und bronchialer Deposition	18

7.3	Abbildungsverzeichnis	Seite
Abbildung 1.	Zytospin/Durchflusszytometrie Vergleich	19
Abbildung 2.	AAT Konzentration im induzierten Sputum	20
Abbildung 3.	Aktivität der freien Elastase in induziertem Sputum	21
Abbildung 4.	Prozentuale Anteile der NG	22
Abbildung 5.	CD11b Expression auf den NG	23
Abbildung 6.	TNF- α und LTB ₄ im Sputumüberstand	24
Abbildung 7.	IL-1 β im Sputumüberstand	25
Abbildung 8.	IL-8 im Sputumüberstand	25
Abbildung 9.	Korrelation der freien Elastase mit den IL-8 Spiegeln	26
Abbildung 10.	Korrelation der IL-8 Spiegel mit den NG	26
Abbildung 11.	Korrelation der NG mit der freien Elastase	27
Abbildung 12.	Auswirkung und Bedeutung von AAT als Schutzmechanismus bei CF	34

7.4 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. M. Griesse für die Überlassung des Themas und die Betreuung meiner Arbeit.

Bei meinem Mitbetreuer Herrn Dr. med. D. Hartl möchte ich mich ganz besonders herzlich für seine direkte und kollegiale Art bei der Betreuung meiner Doktorarbeit bedanken. Seine Ratschläge und Ideen trugen entscheidend zum Gelingen meiner Arbeit bei.

Herrn Prof. Dr. med. D. Reinhardt möchte ich für die Möglichkeit der Durchführung meiner Arbeit in den Laboratorien der AG Pädiatrische Immunologie am Forschungszentrum Kubus des Dr. von Haunerschen Kinderspitals der Ludwig-Maximilians-Universität München danken.

Bei Frau Andrea Schams und Frau Stefanie Gruschka möchte ich mich für die exzellente Aufbereitung der Sputumproben bedanken.

Bei meiner Frau Nicole möchte ich mich besonders herzlich für Ihre unermüdliche Ausdauer und Unterstützung bedanken.

Bei meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und meinen Freunden möchte ich mich für ihren steten Beistand und ihre Hilfe während der gesamten Zeit meines beruflichen Werdeganges bedanken.

7.5. Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum	22.09.1976
Geburtsort	Pfaffenhofen a.d.Ilm
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	verheiratet
Konfession	r.-k.
Familie	Nicole Petersen Jakob und Johanna Hainzlmaier Philipp Hainzlmaier

Schulbildung

1983-1987	Grundschule Pfaffenhofen
1987-1996	Schyren-Gymnasium Pfaffenhofen

Studium

11/1997	Immatrikulation an der Ludwig-Maximilians-Universität München
07/2003	Staatsexamen
08/2003	Approbation

Beruf

04/2004- 03/2006	Tätigkeit als Zahnarzt in der Praxis Dr. Gerhard Amler, Pfaffenhofen
seit 04/2006	Tätigkeit als Zahnarzt in der Zahnärztlichen Gemeinschaftspraxis Drs. Walter und Renate Riedel, Elfershausen